

СОДЕРЖАНИЕ

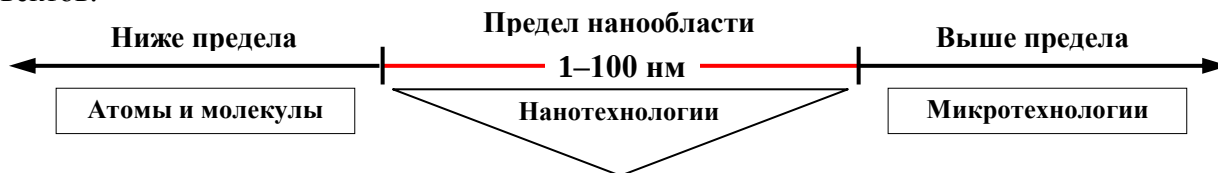
Введение	4
НОВЫЕ СТРАТЕГИИ ТЕРАПИИ ПАТОЛОГИЙ – ОТ ХИМИОТЕРАПИИ К БИОТЕРАПИИ	9
ПРИЧИНЫ НЕДОСТАТОЧНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАДИЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ	10
Общие концепции лекарственной устойчивости	10
Восприимчивость опухолей к химиотерапии	12
Основные классы химиопрепаратов	13
Побочные эффекты при химиотерапии	18
Феномен множественной лекарственной устойчивости.....	19
Белки, участвующие в проявлении МЛУ	22
Экспрессия белка Р170 при МЛУ	25
Компартментализация химиопрепаратов и МЛУ	26
МЛУ и противоопухолевая терапия.....	27
СТРАТЕГИИ СОЗДАНИЯ НАНОПРЕПАРАТОВ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ	28
Преимущества и недостатки препаратов направленного действия.....	30
Способы присоединения терапевтических агентов к векторным молекулам	32
Эффективность препаратов направленного действия.....	34
Неспецифические механизмы поступления препаратов в клетку	37
Свойства опухолей	40
Антигены поверхности опухолевых клеток	45
Эффективность интернализации	46
Проницаемость опухолевых кровеносных сосудов.....	47
Метастазирование	51
Особенности опухолевого метаболизма.....	55
ХИМИЧЕСКОЕ КОНЬЮГИРОВАНИЕ – КЛЮЧЕВОЙ ИНСТРУМЕНТ НАНОТЕХНОЛОГИЙ	57
Реагенты для получения конъюгатов.....	57
Кросс-линкеры «нулевой длины»	57
Гомобифункциональные кросс-линкеры.....	59
Гетеробифункциональные кросс-линкеры	67
Трифункциональные кросс-линкеры	74
Реагенты для флуоресцентного мечения	74
Реагенты для радиоактивного мечения.....	78
Реагенты для биотинилирования.....	81
КОНЬЮГАТЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ	84
Становление и развитие концепции «магической пули»	84
Антитела как молекулярные векторы	90
Основные мишени действия иммуноконъюгатов.....	92

Иммунотоксины	94
Радиоиммуноконъюгаты.....	99
Общие сведения о строении атома и химических элементах	99
Изотопы для биомедицинских исследований	103
Принципы терапевтического применения радиоиммуноконъюгатов.....	108
Биотинилированные антитела	114
Применение конъюгатов в онкологии	120
Препараты на основе антител	120
Препараты на основе белков.....	124
Причины низкой эффективности действия иммуноконъюгатов	127
НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ.....	129
Транспортные наночастицы и переносчики терапевтических агентов	129
Применение полиэтиленгликолей в нанотехнологии и медицине	132
Пэгилированные белки.....	136
Липидные наночастицы.....	137
Кубосомы.....	143
Дискосомы	141
Липидные ленты	142
Кохлиты	143
Жировые микроэмульсии.....	137
Масляные суспензии.....	141
Твердые липидные наночастицы.....	141
Липидные микротрубки	143
Липидные микропузырьки	143
Липосомы	144
Мицеллы	150
Виросомы.....	150
Полимерные наночастицы	152
Полимерные нанокапсулы и наносферы	152
Полимерные мицеллы	154
Дендримеры.....	154
Неорганические наночастицы	156
Керамические наночастицы	156
Металлические наночастицы	158
Нанокристаллы.....	160
Квантовые точки	161
Магнитные наночастицы.....	166
Наночастицы оксидов цинка, титана, церия и кремния	169
Наночастицы фосфата кальция.....	169
Наноклетки и нанораковины	169
Фуллерены и нанотрубки	174
Методы получения наночастиц	178
Биочипы – назначение и принципы функционирования.....	179

Перспективы развития медицинской нанобиотехнологии	181
НАНОПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА	183
Подходы к блокированию ЭФР-зависимой активации опухолевого роста	183
Препараты, блокирующие взаимодействие ЭФР с рецептором.....	186
Препараты – ингибиторы тирозинкиназной активности рецептора ЭФР	188
Препараты, подавляющие синтез и секрецию ЭФР и его рецептора.....	188
ЭФР как векторный компонент препаратов направленного действия.....	190
Конъюгаты ЭФР с противоопухолевыми антибиотиками и алкалоидами	190
Рекомбинантные химерные токсины	193
Конъюгаты ЭФР с носителями радионуклидов	193
Конъюгаты ЭФР с фотоцитотоксическими соединениями.....	194
Конъюгат ЭФР с генистеином	197
ЭФР как векторный компонент наночастиц	197
Роль ЭФР и его рецептора в опухолевом ангиогенезе.....	199
Антиангиогенные препараты, действующие на систему ЭФР–рецептор ЭФР	202
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	204
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	206

Введение

Нанотехнология представляет собой одно из многообещающих и бурно развивающихся направлений современной науки. Развитие нанотехнологии столь стремительно, что зачастую только что появившаяся в литературе информация быстро устаревает и заменяется на новую. Для каждого государства развитие нанотехнологии является одной из приоритетных задач, и поэтому национальные программы комплексного развития нанотехнологий приняты в большинстве экономически развитых стран. Приоритетными направлениями реализации нанотехнологических программ являются: создание новых легких и прочных материалов, разработка запоминающих устройств высокой мощности и разработка новых методов диагностики и лечения онкологических заболеваний. В нашей стране в 2007 г. принята национальная нанопрограмма и создана государственная корпорация «Российская корпорация нанотехнологий» (РОСНАНО), призванная оказывать содействие инновационному внедрению достижений ученых. Термин «нанотехнология» объединяет многочисленные весьма разрозненные, происходящие из различных сфер фундаментальных и прикладных наук представления, подходы и методы воздействия на вещество, поэтому трудно дать точное определение термина. В концепции развития работ в области нанотехнологий в Российской Федерации до 2010 г. дается следующее определение: «Нанотехнология – совокупность методов и приемов, обеспечивающих возможность контролируемым образом создавать и модифицировать объекты, включающие компоненты с размерами менее 100 нм, имеющие принципиально новые качества, позволяющие осуществлять их интеграцию в полноценные функционирующие системы большего масштаба». Нанотехнологию можно рассматривать как междисциплинарную науку, объединяющую и использующую знания фундаментальных и прикладных наук. В термине «нанотехнология» приставка «нано-» (от греч. *nanos* – карлик) означает изменение масштаба в миллиард (10^{-9}) раз, поскольку 1 нм (нанометр) равен 10^{-9} метра. В настоящее время считается, что нанообласть распространяется на объекты, размеры которых лежат в интервале от 1 до 100 нм. Установление нанообласти именно в этом интервале имеет важное значение, поскольку здесь проявляется большинство новых свойств практически любых объектов.



На практике диапазон входящих в сферу деятельности нанотехнологий объектов обычно оказывается гораздо шире – от отдельных атомов и их ассоциаций, или наночастиц, до частиц, содержащих более 10^9 атомов и имеющих размеры, нередко превышающие 1 мкм (1 микрон).

В нанотехнологии вещества с новыми свойствами получают путем манипуляций со строением, составом и размерами объекта. Классическим примером манипуляций со

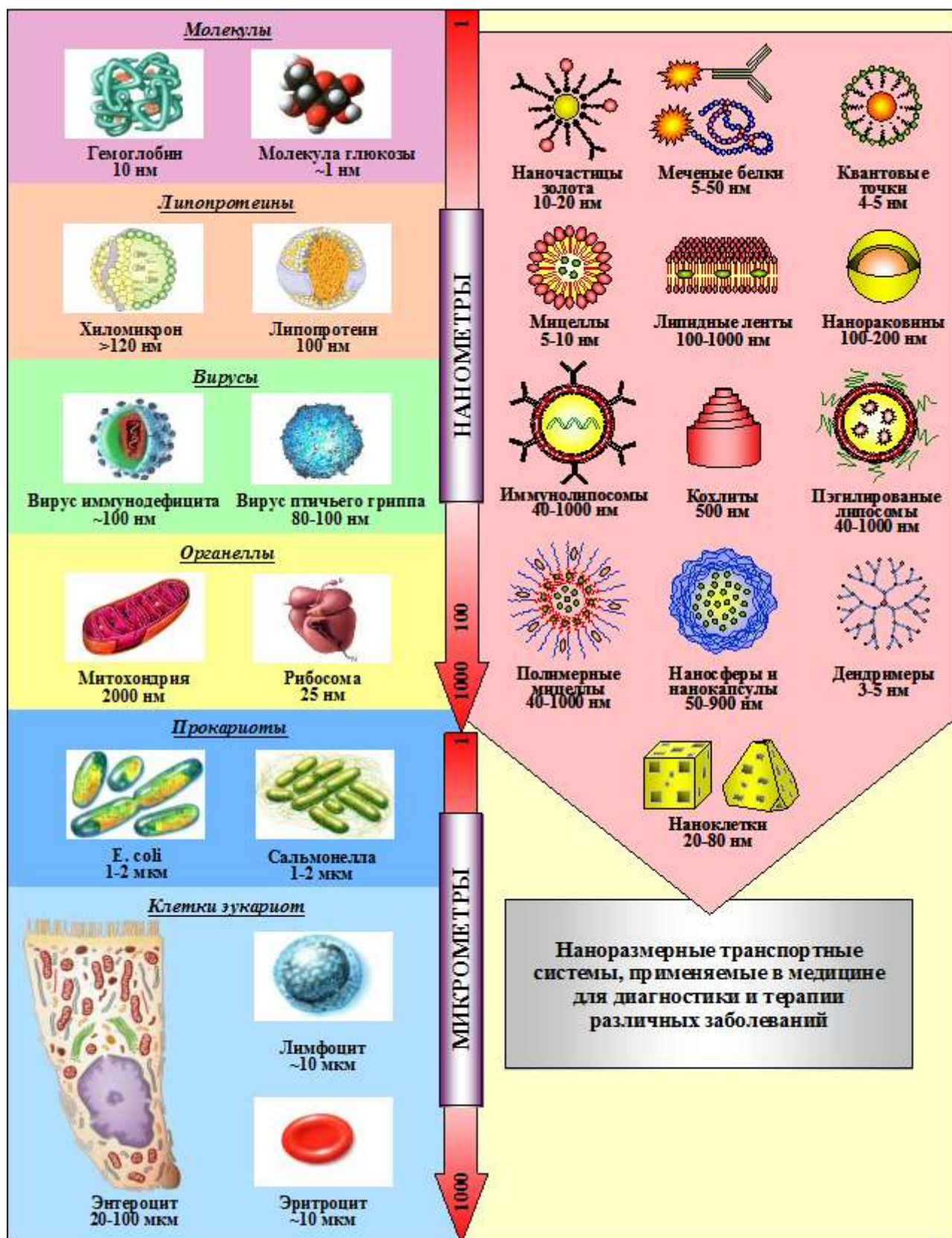


Рис. 1. Сравнительные размеры клеток, органелл, вирусов, природных макромолекулярных структур и наночастиц диагностического и терапевтического назначения.

строением вещества являются модификации твердой фазы углерода. Так, алмаз и графит состоят из одного и того же элемента – углерода, – однако обладают совершенно различными свойствами. Для алмаза характерна высочайшая твердость и отсутствие электропроводности, тогда как графит отличается мягкостью и является хорошим проводником электрического тока. Таким образом, с помощью различных технологий из одного и того же элемента – углерода – можно получать вещества с совершенно разными свойствами. Манипуляции с составом наночастиц являются поистине неисчерпаемым источником получения новых уникальных материалов, компонентов электронных и оптических устройств, средств диагностики и терапии патологий и др. Путем изменения размера частиц вещества можно также добиться проявления новых свойств. Хорошим примером манипуляций с размерами объектов являются квантовые точки, путем изменения размера которых можно регулировать частоту испускаемого ими света.

Какие же объекты следует считать нанобъектами, и относятся ли к ним частицы, волокна и пленки? Согласно классификации по мерности, и наночастицы, и нановолокна, и нанопленки относятся к наноразмерным объектам. Наночастицы (липосомы, кубосомы, нанокристаллы и т.д.) относятся к трехмерным нанобъектам, если их размеры в каждом из трех измерений не превышают 100 нм. Нановолокна, нанотрубки, полимерные системы доставки и др. относятся к двумерным нанобъектам, если их размеры в двух измерениях не превышают 100 нм. Пленки и покрытия относятся к одномерным нанобъектам, если их размеры в одном измерении не превышают 100 нм; два других измерения могут иметь микро- или макроскопические размеры.

Одним из важнейших, активно развивающихся в последние годы направлений нанотехнологии является нанобиотехнология. Следует отметить, что пока четкого общепринятого определения термина «нанобиотехнология» не существует, и нанобиотехнологию можно определить как промежуточную дисциплину между биотехнологией и нанотехнологией. Нанобиотехнология использует результаты, приемы и методы таких дисциплин, как нанотехнология, биотехнология, биология, молекулярная биология, генетика, химия и др. Предметом исследований и разработок нанобиотехнологии выступают как технические наносистемы, так и биологические, функциональные компоненты которых имеют наноразмерные масштабы. Разработки нанобиотехнологии могут найти и уже находят широкое применение в сельском хозяйстве, производстве продуктов питания, экологии, военной промышленности, медицине, фармацевтике и других областях. Особенно актуальным представляется применение разработок нанобиотехнологии в области медицины для диагностики, профилактики и лечения различных патологий. Уже сегодня в диагностических целях широко применяются отличающиеся высокой скоростью и точностью анализа биочипы и различные биотестсистемы, в основе которых лежат разработки нанобиотехнологии. Также большие перспективы ожидают разработанные средствами нанобиотехнологии материалы, способствующие прикреплению и росту клеток, которые могут найти широкое применение в области биологических имплантатов. Несмотря на большое количество присутствующих на фармацевтическом рынке лекарственных

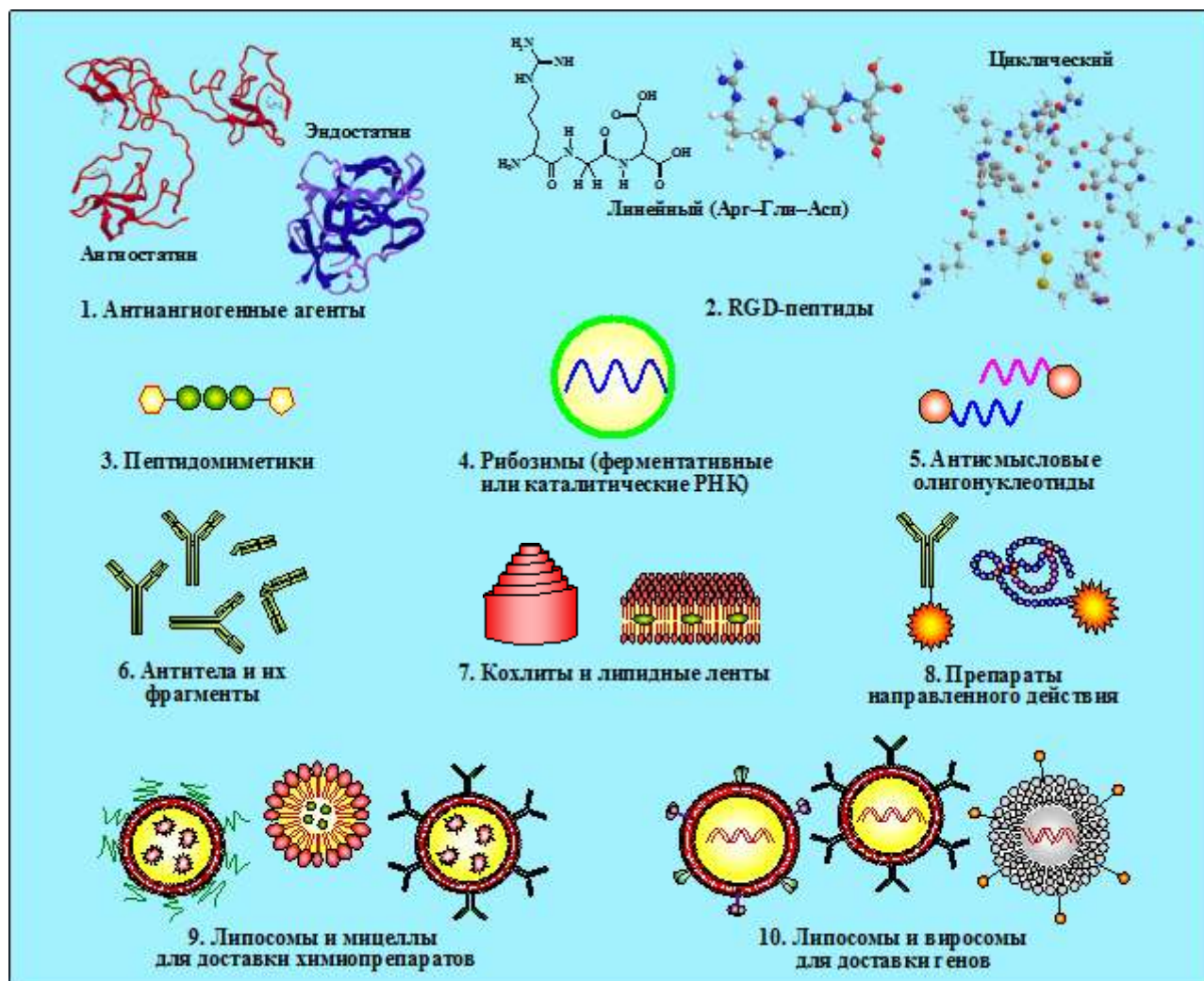


Рис. 2. Некоторые современные средства биотерапии патологий. 1. Антиангиогенные агенты, блокирующие различные стадии васкуляризации опухоли. 2. Синтетические RGD (Арг-Гли-Асп)-пептиды, блокирующие взаимодействие интегринов с элементами ВКМ. Циклические RGD-пептиды (например, $-CRWLRGDWRQC-$) обладают более высокой стабильностью и эффективностью действия по сравнению с линейными. 3. Пептидомиметики – модифицированные пептиды, ингибирующие процессы взаимодействия цитокинов с рецепторами. 4. Рибозимы, блокирующие секрецию факторов роста и экспрессию их рецепторов посредством разрушения мРНК. 5. Антисмысловые олигонуклеотиды, доставляемые в клетку векторными молекулами и блокирующие процессы трансляции цитокинов и их рецепторов в результате инактивирующего взаимодействия с мРНК. 6. Антитела против цитокинов, хемокинов, их рецепторов, интегринов и элементов ВКМ. 7. Кохлиты и липидные ленты построенные из природных фосфолипидов и несущие терапевтические агенты. 8. Препараты направленного действия, состоящие из векторного компонента и связанного с ним химиопрепарата, доставляемого в опухолевые клетки путем рецепторопосредованного эндоцитоза. 9. Иммунолипосомы, пэгилированные липосомы и мицеллы, доставляющие в клетки-мишени химиопрепараты. 10. Иммунолипосомы и виросомы, доставляющие в клетку гены, кодирующие неактивные факторы роста или пептидные токсины.

препаратов, их терапевтическая эффективность часто оказывается недостаточной. Необходим поиск более действенных средств борьбы с патологиями, поэтому важнейшей задачей нанобиотехнологии является создание инновационных наноразмерных транспортных систем, позволяющих осуществлять доставку, в том числе и адресную, биологически активных и лекарственных агентов в клетки-мишени. К таким транспортным системам относятся препараты направленного действия, наносферы, нанокапсулы, квантовые точки, дендримеры, полимерные мицеллы, липосомы, липидные ленты и др. (рис. 1). К преимуществам терапевтического применения наноразмерных транспортных систем относятся возможности: адресной доставки активного вещества к ткани-мишени, увеличения гидрофильности и биодоступности уже известных терапевтических агентов, повышения времени их циркуляции в кровотоке, достижения повышенной проникающей способности препаратов через метаболические и физические барьеры и т.д. В результате применения инновационных разработок нанобиотехнологии может быть достигнуто значительное повышение биологической и терапевтической активности лекарственных препаратов, а также эффективности действия средств ранней диагностики патологий.

Отдельным направлением нанобиотехнологии следует считать разработку средств биотерапии различных патологий и прежде всего онкологических заболеваний. К таким средствам относятся антиангиогенные агенты (ангиостатин, эндостатин, RGD-пептиды), гуманизированные антитела, пептидомиметики, конъюгаты векторных белков с химиопрепаратами и антисмысловыми олигонуклеотидными последовательностями, рибозимы, иммунолипосомы, виросомы и др. (рис. 2). Быстрое развитие нанобиотехнологии и многообразие получаемых ее средствами терапевтических наноразмерных транспортных систем требует определенной систематизации и осмысления имеющихся в литературе сведений.

Настоящая книга посвящена рассмотрению современных нанопрепаратов и диагностических систем, разрабатываемых и применяемых для выявления и терапии различных патологий. В книге также рассматриваются вопросы, связанные с развитием опухолевого процесса, множественной лекарственной устойчивости и причинами недостаточной эффективности действия традиционных противоопухолевых химиопрепаратов. Важный раздел книги посвящен обзору методов и технологий получения нанопрепаратов направленного действия, используемых в диагностических и терапевтических целях. Приводится обзор новейших разработок нанобиотехнологии в области получения наночастиц и рассматриваются возможности и перспективы их практического применения. На примере эпидермального фактора роста человека продемонстрированы критерии подбора белковых векторов для создания препаратов направленного действия. Авторы надеются, что книга будет полезна научным сотрудникам и аспирантам, работающим в области нанобиотехнологии и молекулярной медицины, а также врачам, студентам и всем специалистам, интересующимся применением достижений нанобиотехнологии в медицине.

НОВЫЕ СТРАТЕГИИ ТЕРАПИИ ПАТОЛОГИЙ – ОТ ХИМИОТЕРАПИИ К БИОТЕРАПИИ

В настоящее время разработка стратегий биотерапии патологий переживает период бурного подъема. Широко исследуются и уже применяются на практике средства биотерапии, полученные с помощью различных методов нанобиотехнологии. Особый интерес исследователей и медицинских работников вызывают нанопрепараты, включающие моноклональные антитела, антисмысловые олигонуклеотидные последовательности, рекомбинантные пептидные ингибиторы опухолевого роста и ангиогенеза, векторные пептидные молекулы, осуществляющие направленную доставку химиопрепаратов, липосом и наночастиц в клетки-мишени и многие другие.

Одним из наиболее перспективных направлений нанобиотехнологии является создание нанопрепаратов направленного действия на основе белковых векторов. В качестве таких векторов могут быть успешно использованы антитела, цитокины и другие белки, к которым с помощью кросс-линкеров химически присоединяют различные биологически активные вещества. В настоящее время особенно активно разрабатываются и исследуются нанопрепараты, предназначенные для применения в области онкологии, поскольку прогрессирующий рост числа онкологических заболеваний в мире несет в себе одну из серьезнейших угроз жизни населения Земли в XXI веке. Поэтому перед рассмотрением перспектив создания и результатов исследования активности этих препаратов будут кратко рассмотрены основные положения традиционной химиотерапии онкологических заболеваний, а также проблемы, препятствующие ее эффективному проведению.

В настоящее время применяют три основных метода лечения онкологических заболеваний: хирургию, лучевую терапию и химиотерапию. Реже применяют такие методы, как криогенное воздействие, гипертермия, лазерная и ультразвуковая терапия. Перечисленные методы лечения могут использоваться как самостоятельно, так и в различных сочетаниях друг с другом. Часто используемое в клинической практике сочетание хирургии с лучевой терапией называется комбинированным лечением. Совместное применение химиотерапии с лучевой терапией или с хирургическим вмешательством, а также совместное использование всех трех методов обозначают термином «комплексное лечение». Несмотря на то, что хирургия продолжает оставаться главным методом лечения онкологических заболеваний, химиотерапия является одним из перспективных, постоянно развивающихся направлений практической онкологии. Данные клинической практики свидетельствуют о том, что применение химиотерапии часто оказывает позитивное влияние на статистику выживания пациентов при лечении некоторых видов онкологических заболеваний. Поскольку наиболее чувствительными к химиотерапии являются интенсивно развивающиеся опухоли, в отсутствие лечения вызывающие быстрый летальный исход, при лечении детских онкологических заболеваний во многих случаях отмечается высокая эффективность химиотерапии [111, 100]. Напротив, химиотерапия реже применяется при лечении широко распространенных опухолей эпителиального происхождения у взрослых

пациентов. Именно эти виды рака, включая рак легкого, пищеварительного тракта, молочной железы и простаты, приводят к смерти 50–60% всех больных, умирающих от онкологических заболеваний [100]. Обычно медленно развивающиеся опухоли отличаются высокой устойчивостью к химиотерапии и наиболее широко распространены у пациентов в возрасте от 25 до 50 лет. В целом восприимчивость опухолей к терапевтическому воздействию определяется комбинацией ряда факторов, важнейшими из которых являются возраст пациентов, скорость развития опухоли и лекарственная устойчивость [111].

Проблема первичной и приобретенной резистентности опухолевых клеток к химиопрепаратам заслуживает отдельного рассмотрения, поскольку является одной из основных причин, существенно ограничивающих возможности химиотерапии злокачественных новообразований. Среди наиболее часто наблюдаемых и интенсивно изучаемых форм устойчивости опухолей к различным химиопрепаратам выделяется множественная лекарственная устойчивость.

ПРИЧИНЫ НЕДОСТАТОЧНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАДИЦИОННОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

Общие концепции лекарственной устойчивости

Проблема лекарственной устойчивости так же стара, как и сама цитотоксическая химиотерапия. Как и в случае антимикробной химиотерапии, недостаточная эффективность противоопухолевой терапии может быть обусловлена возникающим в процессе лечения быстрым увеличением числа резистентных к препарату опухолевых клеток. При этом токсичность препаратов по отношению к нормальным клеткам организма остается прежней, и для уничтожения резистентных опухолевых клеток возникает необходимость в повышении доз препарата. Однако повышенные дозы становятся непереносимыми для нормальных клеток, в результате чего теряется целесообразность дальнейшего применения данного химиопрепарата, и необходимо искать пути преодоления возникшего затруднения.

Представления о механизмах устойчивости претерпевали значительные изменения на протяжении ряда лет. Первоначально в качестве основного постулировался кинетический механизм лекарственной резистентности. Согласно данному механизму, наибольшей резистентностью обладают непролиферирующие клетки, находящиеся в фазе G_0 [37], и поэтому усилия исследователей были направлены на поиск токсических веществ, способных разрушить эти покоящиеся клетки.

Второй основной механизм резистентности основывался на фармакологических и фармакокинетических представлениях. В данном случае токсическое вещество не может разрушить раковые клетки, если оно не достигнет опухоли в адекватных концентрациях за соответствующий период времени [38]. Постулированный механизм резистентности включал все аспекты распределения противоопухолевого вещества в организме, экскреции,

недостаточно эффективного проникновения вещества в опухолевые клетки, гематоэнцефалический барьер, метаболизм и др. Главным препятствием на пути увеличения эффективности противоопухолевого воздействия, согласно представленной концепции резистентности, являются обычно возникающие затруднения в оценке концентрации химиотерапевтических препаратов в опухолевой ткани. В целом постулирование данного механизма инициировало интенсивные фармакокинетические исследования, значительно расширившие представления о химиотерапии онкологических заболеваний.

Позднее широкое развитие получила концепция биохимической лекарственной устойчивости, построенная на постулированных биохимических механизмах действия таких противоопухолевых агентов, как метотрексат и фторурацил. Данный подход позволил предложить ряд экспериментально проверяемых гипотез лекарственной устойчивости, основанных на биохимических изменениях в клетке.

Генетический подход к пониманию механизмов лекарственной устойчивости был предложен Дж. Голди и А. Колдманом, показавшими в 1974 г. наличие клонов клеток с различной чувствительностью к противоопухолевым препаратам, что объяснялось авторами естественными спонтанными мутациями [110]. Данные представления согласуются со сведениями о мутациях, увеличивающих устойчивость клеток к химиопрепаратам, с которыми они никогда не сталкивались.

В последние годы развитие опухоли рассматривается в виде многоступенчатого процесса, требующего нескольких мутаций для трансформирования нормальной клетки в опухолевую. Во многих случаях опухоли характеризуются высокой степенью генетической нестабильности, приводящей к возникновению клонов резистентных клеток, развитие которых приводит к проявлению детектируемых клинических признаков онкологического заболевания. Таким образом, клеточная популяция, образующая опухоль, является высоко гетерогенной генетически и биологически. Ко времени постановки диагноза большинство опухолей, особенно у пациентов пожилого возраста, составляют субпопуляции клеток, различающиеся по таким важным признакам, как скорость роста, уровень экспрессии гормонов и различных рецепторов, устойчивость к сигналам подавления клеточной пролиферации и др. Кроме того, в процессе развития опухолей происходит отбор субпопуляций клеток, которые в результате мутаций приобретают устойчивость к цитотоксическим агентам. С помощью представленных концепций могут быть частично объяснены причины известных феноменов – более высокой агрессивности и устойчивости к терапии опухолей крупных размеров. Следует отметить еще две гипотезы, базирующиеся на генетических подходах. Первая гипотеза предполагает наличие изначально существующих «преддетерминированных», устойчивых к цитотоксическим веществам субпопуляций клеток (первичная резистентность), которые селекционируются в процессе химиотерапии (приобретенная резистентность). Вторая гипотеза предполагает наличие мутаций, возникающих в присутствии цитотоксического вещества и приводящих к повышенной резистентности опухолевых клеток (приобретенная резистентность) [26]. При этом, поскольку мутации в принципе необратимы, резистентность сохраняется впоследствии и в

отсутствие цитотоксического агента. Генетическая основа резистентности опухолевых клеток к цитотоксическим веществам была убедительно подтверждена работами Дж. Бидлера и Б. Спенглера [19], а также Р. Шимке с соавт. [4], которые обнаружили, что амплифицированная ДНК в клеточных линиях, резистентных к метотрексату, содержит дополнительные копии гена, кодирующего фермент дегидрофолатредуктазу. Техники клонирования и секвенирования генов позволили также обнаружить другие генетические изменения, лежащие в основе нескольких форм лекарственной устойчивости. В частности, клонирование гена Р-гликопротеина (Р170) – белка-транспортера лекарственных веществ – позволило прийти к пониманию механизма множественной лекарственной устойчивости на молекулярном уровне.

Восприимчивость опухолей к химиотерапии

По восприимчивости к химиотерапии опухоли можно условно разделить на три класса: чувствительные, умеренно чувствительные и устойчивые. Как уже отмечалось, опухоли, возникшие у пожилых пациентов, как правило, менее чувствительны к химиотерапии, чем опухоли молодых пациентов. Повышенная устойчивость к химиотерапии может быть связана как с низкой скоростью роста опухолей, обуславливающей снижение их восприимчивости к действию препаратов, так и с более длительным периодом роста опухоли, в течение которого «мутации резистентности» могут активировать механизмы лекарственной устойчивости. Детские быстро образующиеся опухоли, главным образом гематологические, обычно чувствительны к химиотерапии. Так, детские лейкомии и лимфомы могут быть полностью излечены посредством химиотерапии. Также высокой чувствительностью к химиотерапии отличается детская эмбриональная нефробластома почки. В противоположность этому, почечная клеточная карцинома взрослых является одной из наиболее устойчивых к химиотерапии опухолей [355].

Некоторые опухоли проявляют умеренную резистентность к химиотерапии. К этой категории принадлежат распространенные типы опухолей, такие как рак молочной железы и яичника, мелкоклеточный рак легкого и острая миелоидная лейкомия. Несмотря на относительную уязвимость умеренно резистентных опухолей к химиопрепаратам, после проведения курса терапии опухоли вновь развиваются, но при этом уже обладают очень высокой химиорезистентностью. В качестве типичного примера можно привести пациентов с раком яичника, лечение которых цисплатином приводит к долговременному увеличению продолжительности их жизни. Тем не менее, со временем у большинства пациентов наблюдается рецидив болезни, приводящий к летальному исходу [233]. Еще более драматичным примером является мелкоклеточный рак легкого, проявляющий очень высокую первоначальную чувствительность к комбинированной химиотерапии доксорубицином и этопозидом. Однако, несмотря на высокую чувствительность опухоли, у большинства пациентов в скором времени наблюдается рецидив болезни, сопровождающийся развитием резистентности ко всем химиопрепаратам. В данном случае

мутации, вызывающие резистентность, можно отнести к приобретенным, хотя неизвестно, имела ли место селекция уже существующих субклонов или мутация, произошедшая в процессе химиотерапии.

Третья группа опухолей характеризуется высокой устойчивостью к химиопрепаратам, проявляющейся уже на стадии диагностики, и поэтому химиотерапия неэффективна при лечении подобного рода заболеваний. К онкологическим заболеваниям данной группы относятся почечный клеточный рак, карциномы пищеварительного тракта и легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак поджелудочной железы и злокачественная меланома. Следует отметить, что даже в этой группе пациентов в отдельных случаях может наблюдаться полная ремиссия при проведении химиотерапии [185]. Причины возникновения быстрой или уже имеющейся клинической химиорезистентности у таких опухолей, как немелкоклеточный рак легкого, злокачественная меланома или почечный клеточный рак, до настоящего времени остаются неизвестными. Многие из опухолей подобных типов происходят из эпителиальных тканей, находящихся в контакте с окружающей средой, канцерогенами или радиацией. Представляется вероятным, что эпителиальные ткани обладают нормальными защитными механизмами против цитотоксических воздействий, и данные механизмы резистентности могут проявляться и в происходящих от них злокачественных клетках [125].

Очевидно, что для проведения действенной терапии устойчивых к химиопрепаратам опухолей необходим поиск новых противоопухолевых агентов, обладающих более высокой избирательностью и эффективностью действия. Альтернативным подходом является повышение избирательности действия уже применяющихся в клинике химиопрепаратов. Такой подход может быть реализован при применении противоопухолевых агентов в виде конъюгатов с векторными молекулами (антитела, факторы роста, онкофетальные белки и т.д.) или в составе «нацеленных» липосом и наночастиц.

Основные классы химиопрепаратов

В настоящее время для химиотерапии злокачественных новообразований применяется более сотни химических препаратов и постоянно разрабатываются новые. В данном разделе книги мы кратко рассмотрим основные классы противоопухолевых препаратов. Главным недостатком этих препаратов является низкая избирательность действия в отношении опухолей. Одним из путей повышения избирательности действия является адресная доставка химиопрепаратов в опухолевые клетки с помощью белковых векторных молекул. Антрациклиновые антибиотики, растительные алкалоиды и фталоцианины относятся к наиболее перспективным веществам, физико-химические и терапевтические свойства которых позволяют осуществить повышение избирательности их действия за счет направленного транспорта к опухолевым клеткам-мишеням с помощью белковых векторов.

Алкилирующие агенты являются одними из первых химиопрепаратов, которые были успешно применены в противоопухолевой терапии. В настоящее время алкилирующие

агенты остаются важными терапевтическими средствами, применяемыми как самостоятельно, так и в комбинации с другими препаратами. Хотя к этой группе относятся структурно гетерогенные вещества, общим их свойством является возможность образования положительно заряженных электрофильных (алкильных) групп, атакующих биологические молекулы. Противоопухолевое действие данных веществ основано на формировании комплексов с ДНК, активно препятствующих нормальному функционированию генного аппарата. Двумя типичными представителями группы алкилирующих агентов являются мелфалан и циклофосфамид (рис. 3). Мелфалан применяют при лечении множественной меланомы и некоторых солидных опухолей, а циклофосфамид – рака молочной железы и других опухолей.

Комплексы платины, главным образом цисплатин и карбоплатин (рис. 3), применяют при проведении комбинированной терапии рака яичка, а также при лечении рака головы, шеи, легкого и мочевого пузыря. Механизм цитотоксического действия цисплатина заключается в ковалентном связывании с нуклеотидами ДНК и РНК и в меньшей степени с белками. Формирование комплексов с ДНК является основой токсического действия веществ этой группы.

Антиметаболиты. Наиболее важными антиметаболитами, применяемыми для терапии рака, являются метотрексат, фторурацил, фторафур и цитарабин (рис. 3). Метотрексат – антагонист фолиевой кислоты; фторурацил, фторафур и цитарабин – аналоги пиримидина. Метотрексат как антифолиевый препарат образует с дегидрофолатредуктазой прочный комплекс и тем самым блокирует образование из тетрагидрофолиевой кислоты формилтетрагидрофолиевой кислоты и других производных, необходимых для синтеза пуринов, тимидиловой кислоты, метионина, серина и гистидина. Характерная особенность других антиметаболитов (аналогов пуринов и пиримидинов) состоит в том, что они под действием клеточных ферментов претерпевают «летальный синтез» и превращаются в биологически активные нуклеотиды, ингибирующие активность ферментов.

Эпиподофиллотоксины и амсакрин. Эпиподофиллотоксины – этопозид (VP16) и тенипозид (VM26) (рис. 3) – являются гликозидными производными подофиллотоксина из растения мандрагоры (*Podophyllum peltatum*). Эти вещества имеют большое клиническое значение при проведении терапии лимфом, лейкоз и мелкоклеточного рака легкого. Как и у антрациклинов, механизм действия этих веществ заключается в образовании тройного комплекса препарат–ДНК–топоизомераза II с последующей фрагментацией ДНК, однако, в отличие от антрациклинов, эпиподофиллотоксины не интеркалируют в ДНК.

Амсакрин – акридиновый краситель, который интеркалирует в цепи ДНК и при участии топоизомеразы II вызывает их множественные разрывы, что приводит к нарушению нормального функционирования и последующей гибели клетки. Амсакрин применяют в комбинации с цитарабином при лечении острой миелоидной лейкемии, устойчивой к действию антрациклинов.

Важно отметить, что устойчивость опухолевых клеток к действующим на топоизомеразу II веществам, таким как митоксантрон, антрациклины и особенно этопозид и

амсакрин, обычно связана с повышением уровня экспрессии или активности топоизомеразы II.

Фталоцианины. Относительно новым видом терапии злокачественных новообразований (рак мочевого пузыря, кожи и головного мозга) является фотодинамическая терапия (ФДТ) [154, 224]. В основе ФДТ лежит способность некоторых препаратов (фотосенсибилизаторов) при облучении светом соответствующей длины волны генерировать синглетный кислород, вызывающий разрушение клеток [316]. При введении в кровотоки фотосенсибилизаторы преимущественно накапливаются в опухолевых тканях, где они связываются с мембранами (плазматическими, митохондриальными, ядерными и

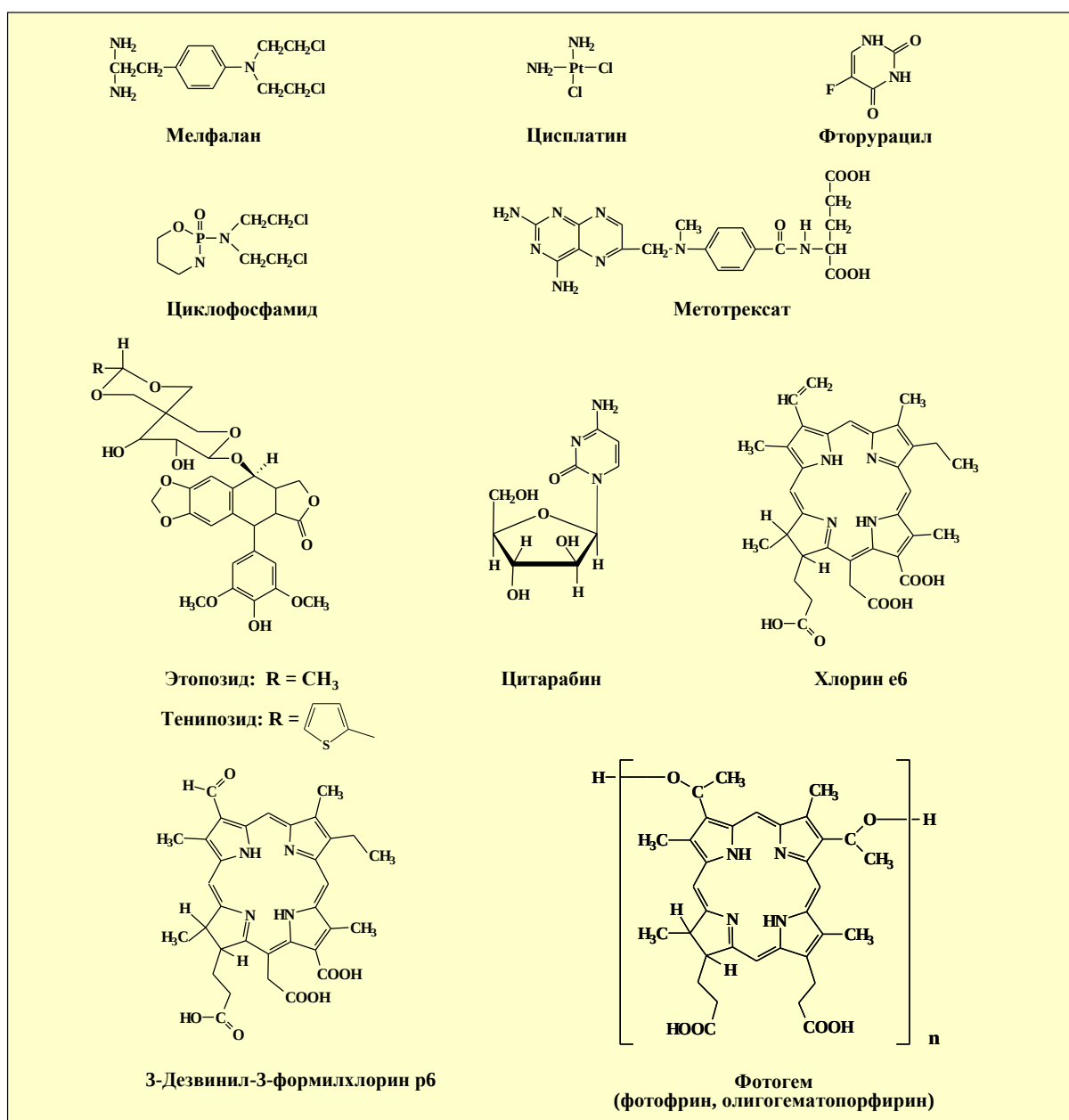


Рис. 3. Химические структуры противоопухолевых препаратов.

мембранами гранулярного эндоплазматического ретикула) [64, 352]. Основными мишенями фотодеструкции после применения фотосенсибилизаторов и облучения ткани являются белки и липиды [212]. В настоящее время в области экспериментальной и практической онкологии наиболее широко используется противоопухолевое фотодинамическое действие фталоцианинов, порфиринов, хлоринов, пурпуринов и бактериохлоринов [230] (рис. 3). Альтернативным подходом к ФДТ является применение темновой (каталитической) терапии, при которой для активации вещества достаточно введения в клеточную среду нетоксичного для организма восстановителя, например аскорбиновой кислоты. При этом, так же как и при ФДТ, происходит генерирование активных форм кислорода, приводящее к деструкции субклеточных структур и гибели клеток. В качестве примера препаратов подобного действия можно привести дисульфохлорид фталоцианина кобальта и окта-4,5-карбоксифталоцианин (терафтал) (рис. 3).

Антрациклины и дактиномицин. Антрациклиновые антибиотики – представители одного из широко применяемых в клинике классов противоопухолевых веществ. Даунорубин является наиболее эффективным препаратом, применяемым при лечении лейкозов. Доксорубин применяется главным образом для терапии солидных опухолей, таких как рак молочной железы и легкого. Антрациклины (рис. 3) продуцируются микроорганизмами рода *Streptomyces* и содержат в структуре молекулы планарные антрахиноновые ядра, с которыми связан аминосахар.

Одним из главных механизмов противоопухолевого действия антрациклинов является модулирование активности топоизомеразы II. Помимо репликации ДНК, этот фермент играет важную роль при подготовке клеток к митозу и, в частности, обеспечивает премитотическую конденсацию и сегрегацию хромосом. В нормальных условиях топоизомераза II катализирует временные разрывы и лигирование цепей ДНК, после чего фермент легко отделяется. Антрациклины стабилизируют комплекс топоизомеразы II с ДНК, и в местах их интеркаляции формируется прочный тройной комплекс антрациклин–топоизомераза II–ДНК. Нарушение нормального функционирования топоизомеразы II приводит к появлению множественных нерепарируемых разрывов в цепях ДНК. В конечном итоге действие антрациклинов приводит к подавлению пролиферации, индукции фрагментации ДНК по апоптотическому механизму и последующей гибели опухолевых клеток.

Дактиномицин (актиномицин D) является природным продуктом, секретируемым микроорганизмами *Streptomyces* sp. В клинике применяется для лечения относительно редких видов опухолей, таких как опухоль Вильмса (нефробластома) и карцинома Юинга. Механизм действия антибиотика заключается в специфическом интеркалировании в двойную спираль ДНК, приводящем к блокированию репликации и транскрипции.

Винкаалкалоиды и таксол. Многие противоопухолевые агенты являются природными продуктами растительного происхождения или их модифицированными производными. Так, винкаалкалоиды (винкристин и винбластин), а также таксол

представляют собой растительные алкалоиды (рис. 3). Винкалкалоиды подавляют пролиферацию опухолевых клеток и широко применяются при лечении злокачественных новообразований как у детей, так и у взрослых пациентов. Таксол был впервые получен в 1971 г., однако его применение было ограничено низкой растворимостью в воде и отсутствием очевидных преимуществ перед другими химиотерапевтическими препаратами. В последние годы, однако, стало очевидным, что таксол обладает достаточно высокой терапевтической активностью в отношении рака яичника и некоторых других видов опухолей. Молекула таксола представляет собой сложную комплексную структуру с 11 оптически активными сайтами и боковой цепью при C-13, существенной для проявления противоопухолевой активности. Механизм цитотоксического действия винкалкалоидов

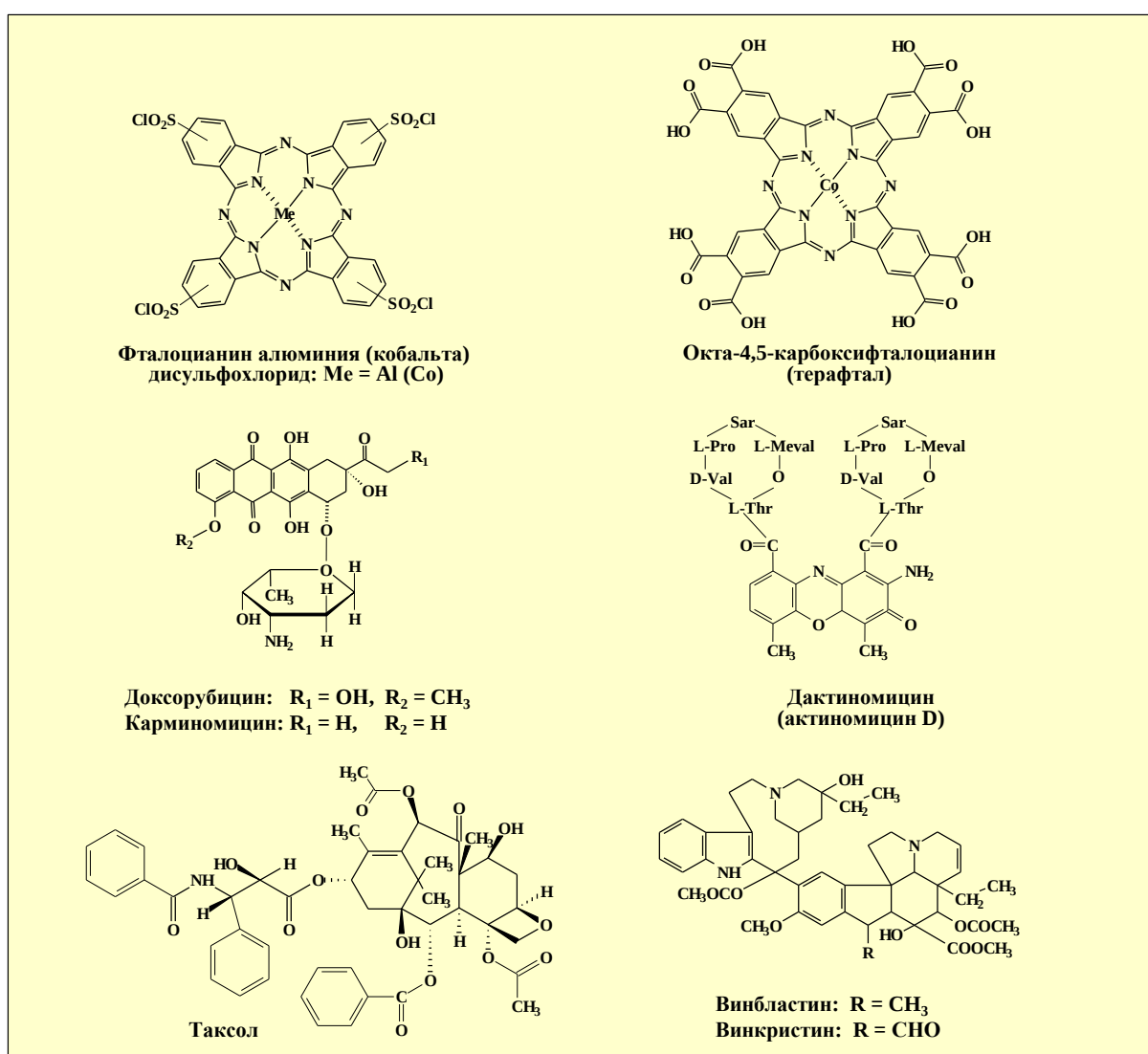


Рис. 3 (продолжение). Химические структуры противоопухолевых препаратов. Обозначения: L-Meal – L-N-метилвалин; L-Pro – L-пролин; Sar – саркозин (N-метилглицин); L-Thr – L-треонин; D-Val – D-валин.

заключается в блокировании механизма сборки микротрубочек, а таксол, напротив, блокирует их разборку. В любом случае, динамическая нестабильность микротрубочек является определяющим фактором при проявлении таких существенных функций клетки, как внутриклеточный транспорт, подвижность и митоз. При этом как таксол, так и винкаалкалоиды подавляют митоз эукариотических клеток, проявляя цитостатическое действие.

Несмотря на целый ряд недостатков, противоопухолевые химиопрепараты находят применение в онкологической практике в качестве средств для паллиативного и радикального лечения злокачественных новообразований. Следует отметить, что для радикального лечения химиотерапия применяется только при высокочувствительных опухолях. Значительно чаще ее назначают с паллиативной целью при распространенных формах злокачественных новообразований или при комплексном лечении совместно с хирургическим вмешательством и лучевой терапией.

Химиопрепараты обычно вводят в вену или принимают перорально. Некоторые из них можно вводить внутривенно, внутримышечно, внутривенно, а также в спинномозговой канал (метотрексат). Для повышения концентрации препарата в очаге поражения используют внутриартериальное и внутрикостное введение.

Побочные эффекты при химиотерапии

Одним из основных недостатков противоопухолевых химиотерапевтических препаратов является низкая избирательность действия в отношении опухолевых клеток. Химиопрепараты практически не обладают избирательностью и активно воздействуют не только на опухоль, но и на пролиферирующие клетки всех органов и тканей. Эффективность действия индивидуальных химиопрепаратов также зависит от фаз клеточного цикла. Клеточный цикл складывается из четырех основных фаз: митоза (М), пресинтеза (G_1), синтеза (S) и премитоза (G_2), последовательно сменяющих друг друга. В связи со значительными структурными и физиологическими изменениями, происходящими при смене фаз, действие препаратов на клетки, находящиеся в различных фазах цикла, существенно различается по степени эффективности. Чаще всего химиопрепараты эффективно действуют на клетки в фазе пресинтеза, несколько реже – в остальных фазах. Отсутствие избирательности действия химиопрепаратов приводит к многочисленным побочным эффектам, сопровождающим их терапевтическое применение. Различают местное и общее побочное токсическое действие препаратов. Местное побочное действие выражается в некрозе мягких тканей при попадании препаратов под кожу, а также возникновении флеботромбоза и тромбоза вены, в которую вводят лекарственное вещество. Общее токсическое действие химиопрепаратов чаще всего оказывают на костный мозг, в результате чего происходит снижение числа лейкоцитов и тромбоцитов в периферической крови. Столь же выражено действие на эпителий желудочно-кишечного тракта, проявляющееся тошнотой, рвотой, поносом, а в некоторых случаях изъязвлением слизистой и кровотечением. Иногда

наблюдаются поражения кожи и репродуктивных органов. Осложнения со стороны сердца, печени, легких возникают реже, и обычно они связаны с характерными особенностями цитотоксического действия индивидуальных препаратов. Так, например, для доксорубицина характерна кардиотоксичность; блеомицин и производные нитрозомочевины могут вызывать пневмониты и легочный фиброз; применение 5-фторурацила приводит к изъязвлению слизистой пищеварительного тракта и желудочно-кишечным кровотечениям. Винкристин и винбластин вызывают токсические полиневриты. Карминомицин, дактиномицин и метотрексат обладают высокой гепатотоксичностью. Токсические эффекты противоопухолевых препаратов существенно ограничивают возможности их клинического применения. Химиотерапия противопоказана беременным, а также больным в терминальной стадии заболевания и в состоянии кахексии, при выраженной легочно-сердечной недостаточности, а также тяжелых органических поражениях печени и почек. Противопоказанием к применению служит также выраженная анемия, лейкопения, тромбоцитопения, а также аллергическая реакция на введение препаратов. Существенно ограничивает возможности химиотерапии злокачественных новообразований первичная и приобретенная резистентность опухолевых клеток к химиопрепаратам.

Феномен множественной лекарственной устойчивости

Наряду с низкой избирательностью действия, одной из главных причин недостаточной терапевтической эффективности противоопухолевых препаратов при лечении злокачественных новообразований является множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), существенный вклад в которую вносит резистентность, обусловленная действием мембранного транспортного белка P170. Само проведение терапии часто является причиной индукции экспрессии P170 в опухолевой ткани и вызывает развитие приобретенной химиорезистентности.

Основа представлений о МЛУ была заложена работами Дж. Бидлера и В. Линга с соавт., которые селекционировали культуры клеток китайского хомячка по их устойчивости к дактиномицину [27, 246] и колхицину [141]. В результате были получены клетки, устойчивые к широкому спектру лекарственных препаратов. Впоследствии было показано, что МЛУ клеток связана с гиперэкспрессией белка плазматической мембраны и мембранного комплекса Гольджи с молекулярной массой 170 кДа, названного Р-гликопротеином (англ. *P-glycoprotein*, *Pgp*), или P170 (рис. 4) [145]. В молекуле белка P170 были идентифицированы два гомологичных по аминокислотной последовательности домена, связанных между собой последовательностью из 60 аминокислотных остатков [404]. Являясь мембранным белком, P170 содержит 12 трансмембранных участков последовательности, которые образуют двустороннюю пору, являющуюся каналом для АТФ-зависимого транспорта веществ. Белок P170 функционально активен в виде димера, осуществляющего энергозависимый выброс терапевтических препаратов из клеток (рис. 5). С наружной стороны плазматической мембраны белок гликозилирован, а на внутренней стороне локализованы два гомологичных

АТФ-связывающих участка (рис. 4). Белок Р170 является представителем семейства транспортных белков ABC (от англ. ATP-binding cassette), которые осуществляют трансмембранный перенос пептидов, олигосахаридов и различных ионов.

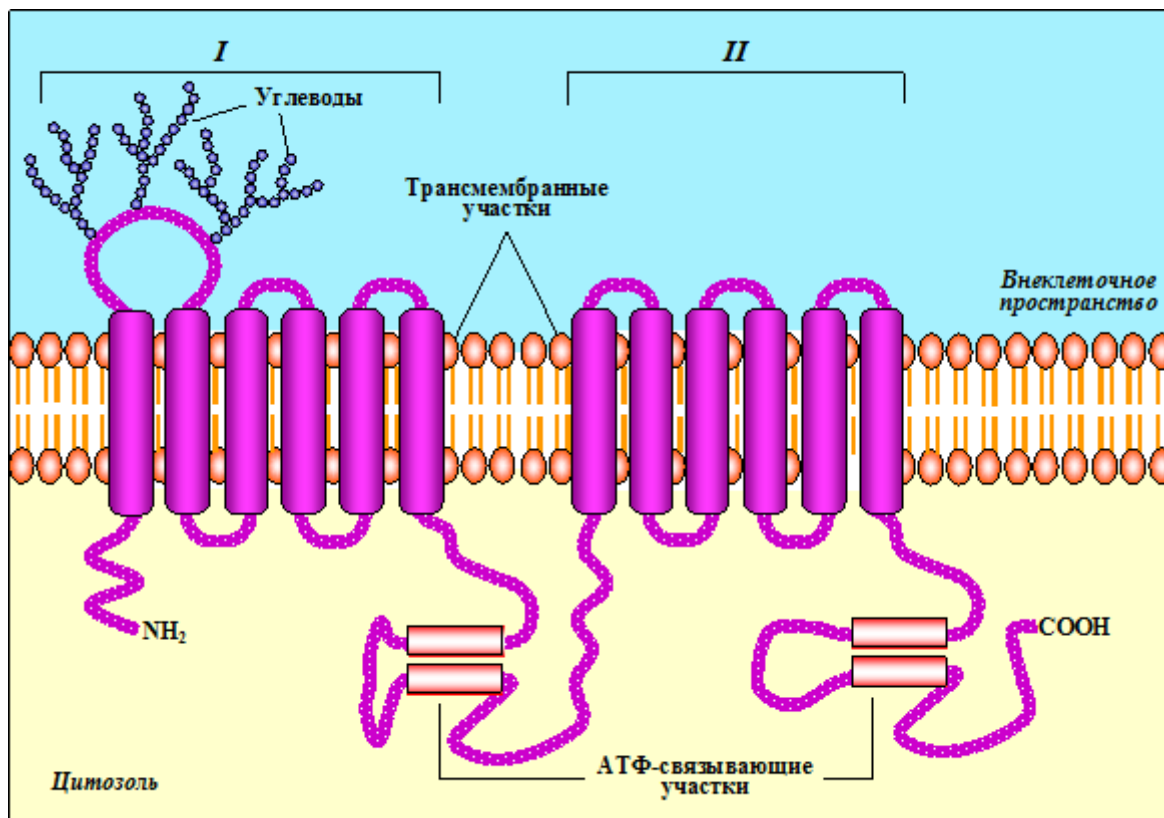


Рис. 4. Схема строения мембранного транспортного гликопротеина Р170. Белок проявляет АТФазную активность и состоит из двух крупных доменов (I и II), включающих трансмембранные участки, и двух АТФ-связывающих доменов. В состав молекулы Р170 входит 1276 аминокислотных остатков, и ее относительная молекулярная масса составляет 170 кДа.

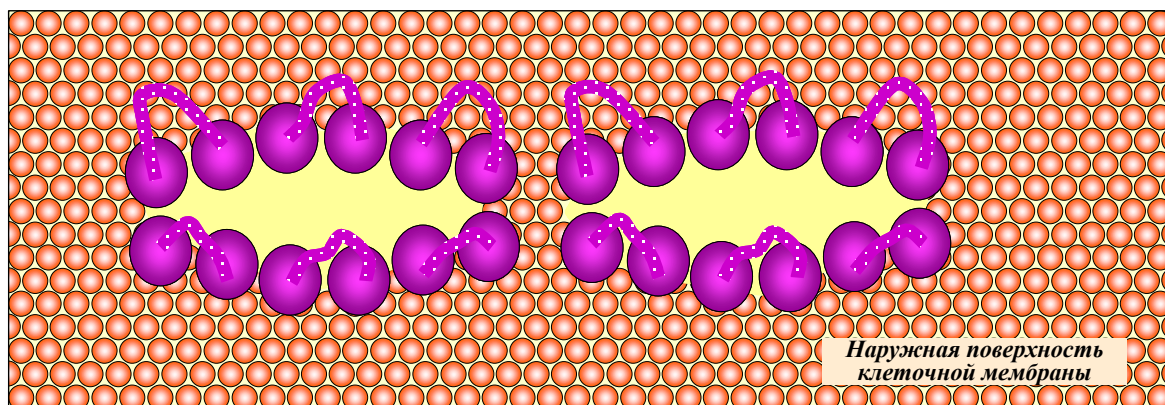


Рис. 5. Мембранная организация транспортного канала Р170. Транспортный канал функционирует в виде димерного комплекса, включающего две трансмембранные поры, каждая из которых сформирована белком Р170. Через транспортные каналы осуществляется энергозависимый выброс химиопрепаратов из клетки.

Белок Р170 осуществляет выброс из клетки широкого спектра химиопрепаратов, различающихся не только структурно, но и по механизму цитотоксического действия. Типичным примером могут служить антрациклины и таксол, воздействующие на разные внутриклеточные мишени и, тем не менее, эффективно выбрасываемые из клетки белком Р170. Наблюдаемое при МЛУ снижение токсичности химиопрепаратов для клеток-мишеней может быть обусловлено не только действием Р170, но и другими механизмами, вызывающими активацию системы клеточной детоксикации, снижение скорости поступления и увеличение скорости выведения химиопрепаратов из клетки и др. Некоторые химиопрепараты не способны проходить через клеточные мембраны и поступают в клетку путем пиноцитоза. В этом случае их изоляция в эндосомных компартментах также может вносить вклад в резистентность клеток [71]. Значительный прогресс в понимании механизма МЛУ был сделан в результате проведения работ по клонированию гена *mdr1* человека и идентификации его белкового продукта Р170 в качестве транспортной молекулы, выводящей лекарственные вещества из клетки [145]. Было установлено, что проявление МЛУ связано с функционированием гена *mdr1*, локализованного в хромосоме 7 человека. Известен также продукт гена *mdr2*, который представляет собой транспортную фосфолипазу поверхности эпителия желчных капилляров, участвующую в транспорте фосфатидилхолина в желчь. При проявлении феномена МЛУ активное выведение химиопрепаратов из резистентных клеток может быть обусловлено повышением уровня экспрессии белка Р170 и амплификацией участка генома, включающего ~6 генов, в число которых входит и ген лекарственной устойчивости *mdr1* (рис. 6). Факторы, вызывающие повышение стабильности мРНК, кодирующей Р170, или увеличение скорости биосинтеза и созревания белка также могут вносить существенный вклад в развитие клеточной МЛУ.

Система экспрессии Р170 отличается высокой гибкостью реагирования на изменение окружающих условий. Так, при воздействии самых разнообразных факторов – радиоактивного облучения, теплового стресса, канцерогенов, токсинов, противоопухолевых препаратов и т.п. – наблюдается быстрая индукция экспрессии гена *mdr1*. Очевидно, что должен существовать внутриклеточный сигнальный каскад, запускающий систему экспрессии этого гена в ответ на действие индуцирующих факторов.

Характерными особенностями клеток, проявляющих МЛУ, связанную с действием мембранных транспортных белков, являются: низкая скорость поступления химиопрепаратов в клетку, высокая скорость их выведения, выведение химиопрепаратов из клетки против градиента концентрации, специфическое внутриклеточное распределение химиопрепаратов (например, низкий уровень накопления в ядре) и др. Связь резистентности с действием белка Р170 (или других транспортных белков) может быть также подтверждена наличием следующих признаков: при насыщающих концентрациях вещества скорость его выведения становится постоянной, а ингибирование активности Р170 приводит к обращению резистентного фенотипа клеток.

Белки, участвующие в проявлении МЛУ

К числу химиопрепаратов, эффективно удаляемых из клетки с помощью механизма активного транспорта, относятся доксорубицин, даунорубицин, карминомицин, винбластин, винкристин, таксол, митоксантрон, этопозид и др. По описанному механизму из клетки не выводятся алкилирующие агенты, антиметаболиты и цисплатин. Следует отметить, что МЛУ в отношении многих веществ, исследуемых как на клеточных культурах, так и в условиях клиники, часто оказывается многофакторной и определяется совместным действием различных механизмов. Так, например, степень резистентности клеток к доксорубицину или этопозиду определяется как уровнем экспрессии белка Р170, так и активностью топоизомеразы II [393].

К настоящему времени наряду с Р170 описаны и другие транспортные белки, осуществляющие АТФ-зависимый выброс из клетки липофильных химиотерапевтических препаратов [44, 145]. Белок MRP (от англ. multidrug resistance associated protein) с мол. массой 190 кДа, так же, как и Р170, является представителем семейства ABC и проявляет АТФазную активность [54]. Ген *mrp1*, кодирующий белок MRP, локализован в хромосоме 16 человека (16p13.1). Эксперименты по трансфекции гена *mrp1* показали возможность искусственно вызывать у клеток чувствительных линий лекарственную резистентность [118].

Белок MRP1 представляет собой один из изотипов MRP, который в отличие от Р170 является глутатионзависимым транспортным белком, осуществляющим выведение химиопрепаратов в виде конъюгатов с глутатионом. Так же, как и Р170, белок MRP1 преимущественно локализуется на поверхности клеток, контактирующих с ксенобиотиками, и оба белка участвуют в удалении химиопрепаратов сходных спектров. Повышенная экспрессия MRP1 наблюдается при некоторых онкологических заболеваниях (лимфолейкоз, миелолейкоз). Сравнительно недавно открытый белок MRP2 частично охарактеризован и описана его специфическая локализация на поверхности гепатоцитов, однако роль в проявлении МЛУ пока не совсем ясна.

Еще одним довольно крупным белком (мол. масса 110 кДа), определяющим МЛУ, является LRP (от англ. lung resistance related protein), ген которого также находится в хромосоме 16 человека (16p11.2). В отличие от Р170 и MRP, белок LRP локализуется в цитоплазме клеток, контактирующих с ксенобиотиками, и является компонентом рибосом. Функции белка LRP в качестве компонента этих органелл пока не установлены. В клетке LRP обнаруживается также в мембранах МВ-эндосом и лизосом, где он может участвовать в процессах инактивации химиопрепаратов или их удаления из клетки путем экзоцитоза.

В линиях клеток, проявляющих МЛУ, но не экспрессирующих Р170, обнаружены также белки Р95 и Р110, отличающиеся аномально высоким уровнем экспрессии, однако их структура и функции изучены слабо [47, 289].

Одной из форм МЛУ, не связанных с транспортом цитотоксических веществ, является лекарственная устойчивость, вызванная активацией системы глутатиона. При поступлении в

клетку химиопрепаратов глутатион образует с ними менее токсичные и более гидрофильные конъюгаты, которые легко выводятся с помощью белков-транспортеров. Активация системы глутатиона (например, повышение уровня глутатионтрансферазы) чаще обнаруживается в клеточных линиях, резистентных к алкилирующим соединениям, однако резистентность к антрациклинам также может быть связана с этой системой. Использование ингибиторов активности глутатионтрансферазы может рассматриваться в качестве инструмента повышения чувствительности опухолевых клеток к действию химиопрепаратов при данном типе лекарственной устойчивости.

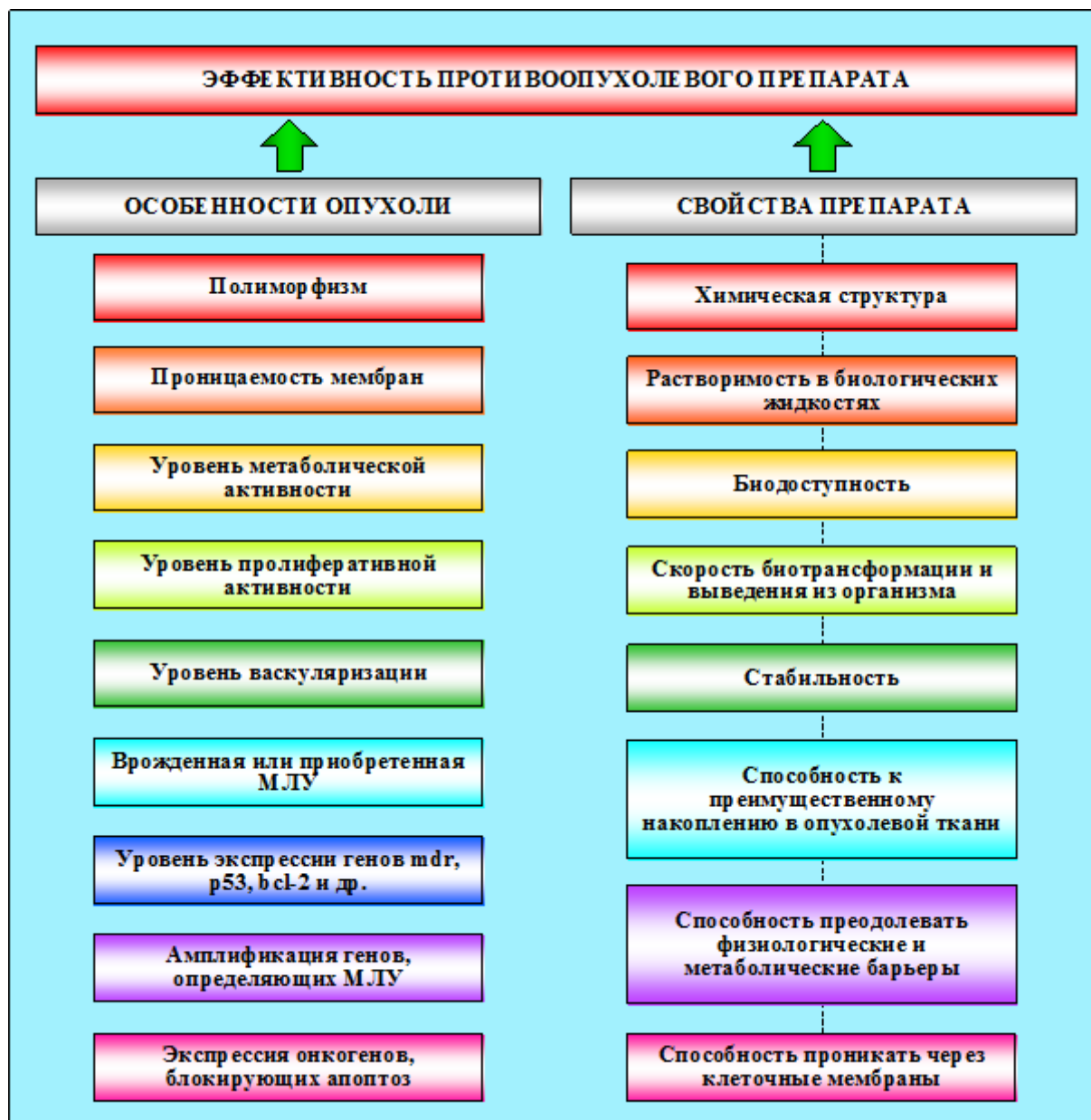


Рис. 6. Факторы, оказывающие влияние на эффективность действия противоопухолевых препаратов. МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; mdr – гены, кодирующие белки, определяющие множественную лекарственную устойчивость; bcl-2 – ген, кодирующий антиапоптотический белок; p53 – ген, кодирующий проапоптотический белок.

МЛУ может быть также связана с уровнем экспрессии топоизомеразы II, играющей ключевую роль в процессе репликации ДНК. Ингибирование активности топоизомеразы II является одним из главных механизмов противоопухолевого действия антрациклинов. Помимо репликации ДНК, этот фермент играет важную роль в подготовке клеток к митозу и, в частности, обеспечивает премитотическую конденсацию и сегрегацию хромосом. В нормальных условиях топоизомераза II катализирует временные разрывы и лигирование цепей ДНК, после чего фермент легко отделяется. Антрациклины стабилизируют комплекс топоизомеразы II с ДНК, и в местах их интеркаляции формируется прочный тройной комплекс антрациклин–топоизомераза II–ДНК. Действие антрациклинов индуцирует множественные нерепарируемые разрывы цепей ДНК, что приводит к остановке движения репликативных вилок и хода транскрипции и вызывает блокирование пролиферации опухолевых клеток. При высоких уровнях накопления антрациклинов в ядре возможна также индукция фрагментации ДНК по апоптотическому механизму. Эксперименты на опухолевых клетках, позволяющие наблюдать под микроскопом формирование апоптотических телец, подтверждают, что антрациклины во многих случаях вызывают апоптотическую гибель опухолевых клеток. При этом также отмечаются значительные изменения в уровнях экспрессии генов, регулирующих этот процесс (например, гиперэкспрессия протоонкогена *c-myc* и снижение экспрессии *bcl-2*). Одними из основных генов, участвующих в регуляции апоптоза, являются *bcl-2* и *p53*. Показано, что обнаруживаемый в злокачественных лимфомах человека продукт экспрессии гена *bcl-2* блокирует апоптоз [148]. Очевидно, что гиперэкспрессия *bcl-2* может повышать устойчивость опухолевых клеток к химиотерапии в результате ингибирования апоптоза [164]. В противоположность *bcl-2*, продукт экспрессии гена-супрессора опухолевого роста *p53* необходим для эффективного выполнения программы апоптотической гибели клеток, индуцируемой доксорубицином, фторурацилом, этопозидом и др. [189]. В процессе микроэволюции опухоли активация онкогенов или мутации гена *p53* могут вызывать снижение уровня экспрессии белка *p53*, поэтому опухолевые клетки становятся более устойчивыми к действию химиопрепаратов, индуцирующих апоптоз [189]. С этим согласуются данные о преобладании субпопуляций клеток, несущих мутации в гене *p53* в опухолях, являющихся «врожденно» химиорезистентными (злокачественная меланома, рак толстой кишки, мочевого пузыря и простаты) [87, 287].

Помимо антрациклинов, ингибиторами активности топоизомеразы II являются алкилирующие агенты, эпиподофиллотоксины, амсакрин и др. [14]. Устойчивые к действию ингибиторов топоизомеразы II опухолевые клетки отличаются низким уровнем экспрессии и специфической субклеточной локализацией фермента. Так, при остром миелобластном лейкозе повышенная резистентность к терапии антрациклинами и этопозидом коррелирует с низким содержанием топоизомеразы II в лейкозных клетках. Некоторые резистентные опухоли экспрессируют мутантную форму топоизомеразы II, устойчивую к ингибирующему действию химиопрепаратов. Во многих случаях в клетках, отличающихся устойчивостью к ингибиторам топоизомеразы II, действуют также другие механизмы резистентности,

связанные, например, с высоким уровнем экспрессии и активности белков-транспортёров.

Экспрессия белка P170 при МЛУ

В норме белок P170 экспрессируется во многих типах клеток человека. При этом наиболее высоким уровнем экспрессии отличаются ткани, входящие в непосредственный контакт с ксенобиотиками или участвующие в их обезвреживании (надпочечники, почки, печень, желудок, кожа, эпителий толстого кишечника, легких, селезенка, лимфоциты). Определение уровня экспрессии гена *mdr1* обычно проводят с помощью полимеразной цепной реакции на мРНК, кодирующей P170. Этим методом экспрессия гена *mdr1* детектировалась во многих, если не во всех нормальных и опухолевых тканях человека [223]. Уровни экспрессии белка P170 в различных тканях также оценивались с помощью иммуногистохимических анализов, в ходе которых было установлено, что высоким уровнем экспрессии P170 отличаются нормальные эпителиальные клетки человека, выстилающие пищеварительный тракт и почечные каналы, а также эндотелиальные клетки кровеносных сосудов мозга и коры надпочечников [59, 354, 355].

Поскольку вопрос о вкладе экспрессии транспортных белков в проявление МЛУ является важным для клинической химиотерапии, был проведен ряд исследований уровней экспрессии белка P170 в опухолях различных типов у пациентов, подвергавшихся химиотерапии [113, 184]. Результаты экспериментов показали, что наиболее высокий уровень экспрессии белка P170 наблюдался в опухолях, происходящих из клеток прямой кишки и почек; в случае рака легкого, напротив, отмечался низкий уровень экспрессии данного белка. Высокий уровень экспрессии белка P170 наблюдался у большинства плохо поддающихся лечению опухолей, дающих рецидивы после проведения химиотерапии. Наиболее уязвимыми для химиопрепаратов являлись опухоли с низким уровнем экспрессии белка P170. Хотя при начале лечения на клеточной поверхности большинства таких опухолей белок P170 отсутствовал или присутствовал в небольшом количестве, после возникновения рецидивов практически во всех случаях отмечался высокий уровень его экспрессии, коррелировавший с проявлением химиорезистентности. Примерами таких опухолей являются острая лимфоидная лейкемия [107, 184], острая миелоидная лейкемия [197, 198, 272, 360], множественная миелома [119], лимфома [215, 248], нейробластома [42], саркома [43] и рак молочной железы [281, 358]. Прямая корреляция между неблагоприятным терапевтическим прогнозом и высоким уровнем экспрессии белка P170 была убедительно установлена лишь в нескольких случаях, в частности при острой миелоидной лейкемии и детских саркомах и нейробластомах, поэтому пока невозможно однозначно позиционировать этот белок в качестве маркера опухолей с наиболее агрессивным фенотипом [42, 43, 107, 249]. Накопленные экспериментальные данные об уровнях экспрессии гена *mdr1* также пока не позволяют сделать определенного заключения о том, что опухоли с высоким уровнем экспрессии P170 однозначно обладают МЛУ, а с низким – МЛУ не обладают. К тому же при количественной оценке содержания мРНК или белка P170 в опухолях не учитывается целый

ряд факторов, имеющих непосредственное отношение к резистентности – посттрансляционные модификации P170 (главным образом фосфорилирование), гетерогенность экспрессии, относительный вклад опосредованного P170 транспорта химиопрепаратов в общий (активный и пассивный) транспорт, наличие в клетке иных механизмов резистентности. Очевидно, что необходимы дополнительные комплексные исследования феномена МЛУ и определяющих его факторов.

Одним из перспективных методов исследования является изучение транспортеров с помощью самих химиопрепаратов. Например, использование флуоресцентных свойств антрациклинов или родаминов [132, 176, 221], транспортируемых белком P170, создает уникальные возможности для функционального изучения P170 или других транспортеров методами проточной цитофлуориметрии или лазерной сканирующей микроскопии [31, 360]. Так, с использованием флуоресцентных свойств доксорубина в клетках острой миелоидной лейкемии, проявляющих МЛУ, была проведена количественная оценка внутриядерного содержания антрациклина с помощью лазерной сканирующей микроскопии [294, 295]. Необходимо отметить, что помимо действия транспортеров, динамика накопления химиопрепаратов в опухолевых клетках в организме может определяться и другими факторами: скоростью их переноса кровью, уровнем деградации, значением вне- и внутриклеточного pH, пассивным поступлением вещества через мембрану и др. В настоящее время определить роль белка P170 в опухолевом процессе и проявлении феномена МЛУ у конкретного пациента сложно, поскольку проведение необходимых исследований в условиях клиники представляется затруднительным.

Компартментализация химиопрепаратов и МЛУ

Действие локализованных в плазматической мембране транспортеров вызывает в клетке значительное снижение уровней противоопухолевых химиопрепаратов. Следует учитывать, что химиопрепараты могут проявлять активность в различных компартментах клетки, например, винкристин действует преимущественно в цитоплазме, а доксорубин – на уровне клеточных мембран и ядра [342]. У наиболее резистентных культур опухолевых клеток наблюдается крайне низкое содержание доксорубина в ядре, что может свидетельствовать в пользу ядерной локализации главной мишени цитотоксического действия антибиотика [105, 296]. В случаях, когда при увеличении концентрации в среде и накоплении цитотоксического вещества в клетке не происходит адекватного изменения значения индекса цитотоксичности IC_{50} (выражает концентрацию химиопрепарата, вызывающую гибель 50% опухолевых клеток), часто используется утверждение о «многофакторной лекарственной устойчивости» без учета характера внутриклеточного распределения цитотоксического вещества [131, 178, 294]. Однако бывают случаи, когда химиопрепарат накапливается в основном в компартментах, где он не проявляет своей активности, и лишь незначительная часть от общего количества препарата оказывает цитотоксическое действие в «уязвимых» компартментах клетки. Это может приводить к

ошибкам в оценке цитотоксичности препарата с помощью показателя IC_{50} , учитывающего лишь общую концентрацию вещества, но не учитывающего его компартментализацию и особенности цитотоксического действия. Сведения о динамике накопления, компартментализации и механизмах цитотоксического действия химиопрепаратов в опухолевых клетках имеют важное теоретическое и практическое значение. Такие сведения позволяют представить целостную детализированную картину патологического процесса и наметить эффективные стратегии терапии. Успех в изучении динамики накопления и внутриклеточного распределения химиопрепарата во многом определяется его физико-химическими свойствами. Например, в сравнении с другими химиопрепаратами изучать динамику накопления широко применяемых в клинике антрациклиновых антибиотиков значительно легче благодаря их интенсивной природной флуоресценции. Для других химиопрепаратов, таких как винкристин или таксол, изучение клеточной фармакокинетики с использованием интактных клеток затруднено, поскольку в отсутствие интенсивной флуоресценции необходимо использовать не прямые методы изучения накопления и внутриклеточного распределения препаратов.

В настоящее время большинство ученых придерживается гипотезы «вакуумного пылесоса», объясняющей действие транспортеров химиопрепаратов, определяющих резистентность клеток. Согласно этой гипотезе транспортер выводит гидрофобные химиопрепараты прямо из клеточных компартментов через плазматическую мембрану, действуя подобно вакуумному пылесосу [115, 359]. Наличие мембранного компартмента, из которого удаляется препарат, было продемонстрировано в экспериментах с резистентными клетками линии SW1573/2R120, содержание даунорубицина в которых уменьшалось в результате транспорта вещества через плазматическую мембрану, чего не наблюдалось в экспериментах с чувствительными клетками [209].

Для разработки эффективных стратегий противоопухолевой терапии важное значение имели бы сведения о влиянии мембранных транспортеров на накопление и компартментализацию химиопрепаратов в опухолевых клетках *in situ* у пациентов с онкологическими заболеваниями.

МЛУ и противоопухолевая терапия

Резистентность опухолевых клеток к химиопрепаратам является одной из главных причин недостаточной эффективности противоопухолевой терапии. Помимо клеточной резистентности важную роль для терапии могут играть и другие факторы – низкий уровень поступления препарата в опухолевую ткань, неоптимальное значение pH для проявления его цитотоксического действия, недостаточная васкуляризация или неблагоприятная локализация опухоли (гематоэнцефалический барьер). Отрицательное влияние таких факторов может быть сведено к минимуму посредством изменения способа введения, повышения дозы или применения более подходящего в данном случае препарата [203]. Однако замена одного химиопрепарата другим часто не дает ожидаемых результатов,

поскольку многие опухоли человека проявляют высокую резистентность ко всем доступным химиотерапевтическим агентам.

В общей стратегии преодоления МЛУ важнейшей задачей является поиск путей снижения отрицательного эффекта транспортеров лекарственных препаратов на ход лечения онкологических заболеваний. В качестве первого агента, снижающего резистентность опухолевых клеток к химиопрепаратам, был использован верапамил – блокатор кальциевого канала и хорошо известный антиаритмический препарат [345]. Было продемонстрировано, что верапамил блокирует выброс некоторых химиотерапевтических агентов из опухолевых клеток. Впоследствии был идентифицирован целый ряд веществ, обладающих способностью к обращению МЛУ (блокаторы кальциевых каналов, стероиды, аналоги гормонов, ингибиторы кальмодулина, циклоспорин и др.), однако только некоторые из них используются в клинике в качестве экспериментальных лекарственных средств [93, 308].

Очевидно, что для повышения эффективности противоопухолевой терапии необходимы дальнейшие углубленные исследования, направленные на разъяснение молекулярных механизмов возникновения, проявления и преодоления МЛУ. Преодоление МЛУ, связанной с белком Р170, может осуществляться путем применения ингибиторов мембранных транспортных АТФаз, а также химиопрепаратов, доставляемых в клетку с помощью белковых векторов, и за счет специфической локализации в эндосомном компартменте выводимых из сферы действия мембранных транспортеров.

СТРАТЕГИИ СОЗДАНИЯ НАНОПРЕПАРАТОВ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

Рецепторопосредованный эндоцитоз является важнейшим транспортным механизмом, позволяющим специфически доставлять терапевтические агенты в клетки-мишени. К настоящему времени создан ряд препаратов направленного действия, базирующихся на процессе рецепторопосредованного эндоцитоза. Имеются многочисленные литературные данные об успешной адресной доставке в опухолевые клетки противоопухолевых агентов [3, 326], токсинов [12, 333], различных антисмысловых последовательностей, генов [243, 369] и др.

Стратегия создания препаратов направленного действия заключается в том, что лиганд, обладающий сродством к специфическому клеточному рецептору, используется в качестве векторной молекулы для доставки терапевтических агентов в клетку. Лиганд ковалентно или нековалентно связывается с терапевтическим агентом, и вся конструкция переносится в клетку путем рецепторопосредованного эндоцитоза. Для связывания лиганда с препаратом обычно используются линкерные молекулы. Например, полилизин является одним из наиболее широко применяемых линкеров, соединяющих антисмысловые олигонуклеотиды с векторными молекулами [243, 244, 369, 373, 374, 376].

При создании препаратов направленного действия обычно преследуют три основные цели:

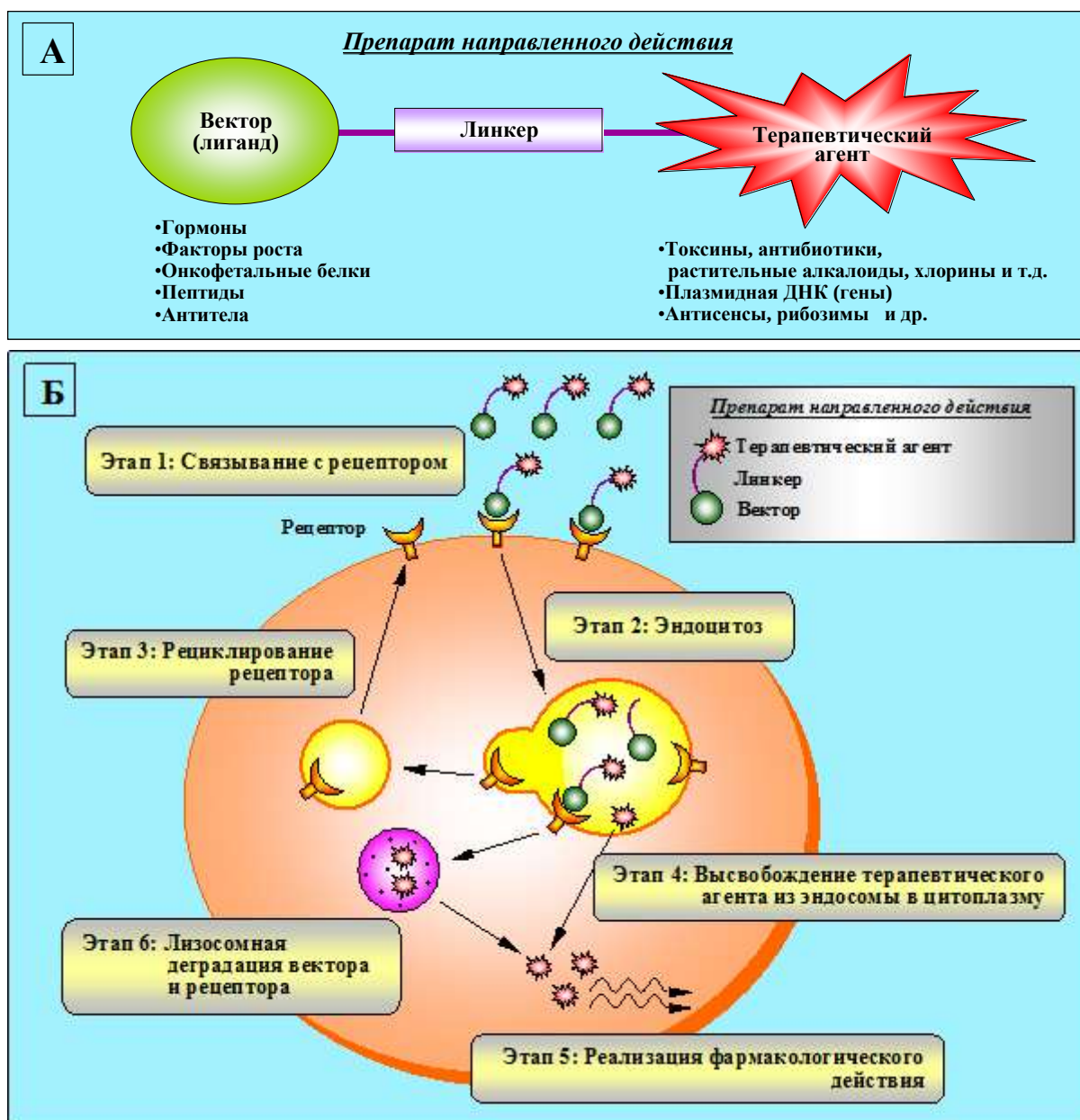


Рис. 7. Подходы к созданию терапевтических препаратов направленного действия. А. Структура препарата направленного действия. Б. Этапы адресной доставки терапевтических агентов в клетку. После связывания с рецептором и интернализации препарата в эндосомном или лизосомном компартменте происходит отделение терапевтического агента от векторной молекулы. Терапевтический агент проходит через мембраны эндосом или лизосом и попадает в цитоплазму или ядро, где оказывает фармакологическое действие. Часть рецепторов, лишенных лиганда и находящихся в мембранах тубулярных выростов эндосом, рециклирует в плазматическую мембрану.

1. Обеспечение избирательности действия терапевтического агента за счет более высокой плотности специфичных для векторного компонента препарата направленного действия рецепторов на поверхности клеток-мишеней по сравнению с

- другими клетками организма;
2. Достижение более высокого уровня накопления терапевтического агента в клетке-мишени при использовании препарата направленного действия по сравнению со свободным препаратом. Препараты направленного действия особенно удобны для доставки в клетки молекул, не проникающих в свободном состоянии через плазматическую мембрану;
 3. Преодоление множественной лекарственной устойчивости за счет специфической компартментализации препаратов направленного действия, выводящей терапевтический агент из сферы действия защитных механизмов клетки.

На рис. 7 представлена структура и механизм поступления в клетку препарата направленного действия. Доставка терапевтического агента в клетку-мишень инициируется формированием комплекса векторного компонента препарата направленного действия с рецептором. Далее комплекс в составе окаймленных везикул попадает в клетку (интернализация) и в ходе внутриклеточного траффика оказывается в мультивезикулярных эндосомах, где происходит отделение препарата направленного действия от рецептора. После поступления в клетку рецепторы могут повторно встраиваться в плазматическую мембрану (рециклирование), распределяться по другим компартментам клетки или подвергаться протеолитической деградации в лизосомах [23, 101]. В случае, когда молекулярная мишень препарата направленного действия находится в цитоплазме, терапевтический агент должен высвободиться в свободном виде из эндосом непосредственно в цитоплазму, где он может проявить фармакологический эффект (рис. 7). Для проявления максимального эффекта необходимо достижение в клетке определенного уровня концентрации терапевтического агента, который во многом определяется уровнем экспрессии рецептора, а также скоростями его интернализации и турновера. Очевидно, что препараты направленного действия поступают в клетку в результате многократно повторяющихся циклов рецепторопосредованного эндоцитоза. Следует учитывать, что при высокой концентрации лиганда во внеклеточном пространстве эффективность поступления макромолекул в клетку значительно снижается в результате обратной регуляции плотности рецепторов на клеточной поверхности (адаптивная реакция).

Преимущества и недостатки препаратов направленного действия

Одним из главных преимуществ применения препаратов направленного действия перед свободными лекарственными препаратами является возможность неинвазивной и адресной доставки терапевтических агентов в клетки-мишени. Кратко преимущества и недостатки препаратов направленного действия можно сформулировать следующим образом:

Преимущества:

1. Специфичность доставки терапевтических агентов в клетки-мишени;

2. Неинвазивность доставки;
3. Высокая скорость накопления препаратов в клетке;
4. Возможность преодоления резистентности клеток к действию терапевтических агентов за счет специфической компартментализации препаратов направленного действия.

Недостатки:

1. Поступление препаратов в везикулярные компартменты, отделенные от цитозоля мембраной;
2. Возможность лизосомной деградации препаратов;
3. Нежелательное поступление препаратов в клетки, экспрессирующие те же рецепторы, что и клетки-мишени.

Необходимо отметить, что известно очень мало примеров, когда только один тип клеток несет на своей поверхности специфический рецептор. Поэтому число рецепторов, которые можно рассматривать как полностью специфические мишени, весьма ограничено. Обычно об избирательности препаратов направленного действия говорят в случаях, когда число рецепторов вектора на поверхности клеток-мишеней во много раз, часто на порядки, превышает их число на поверхности других клеток. Особенно высоким уровнем экспрессии рецепторов отличаются опухолевые клетки, и применение препаратов направленного действия для терапии онкологических заболеваний особенно эффективно. Помимо избирательности действия важными положительными особенностями препаратов направленного действия являются высокая скорость поступления и возможность достижения высокой концентрации терапевтического агента в клетке. Поступившие в клетку лиганд-рецепторные комплексы подвергаются внутриклеточной сортировке, в результате которой терапевтический агент высвобождается из состава препарата направленного действия, часть рецепторов рециклирует в плазматическую мембрану, а векторная молекула (лиганд) подвергается лизосомной деградации (время полужизни интернализированного лиганда обычно составляет ~20 мин [305]). Концентрация лиганда внутри клетки может быть много выше, чем его внеклеточная концентрация. Например, соотношение концентрации эпидермального фактора роста внутри клетки и во внеклеточной среде при определенных условиях может составлять 100:1 [150]. Это означает, что лиганд может накапливаться в клетке в концентрациях, в 100 раз превышающих его концентрацию в окружающей среде. Существенным недостатком препаратов направленного действия является их преимущественно эндосомная локализация, в некоторых случаях не позволяющая препаратам проявить биологическую активность в цитоплазме или ядре [23]. Поэтому препараты направленного действия, не имеющие в своем составе терапевтических агентов, способных преодолевать мембранные барьеры, чаще всего оказываются неэффективными. При создании препаратов направленного действия может быть использовано как ковалентное, так и нековалентное присоединение терапевтического агента к вектору (рис. 8). В обоих случаях препараты конструируются таким образом, чтобы после отделения от векторной молекулы терапевтический агент мог свободно проходить через мембрану

эндосом и проявлять биологическую активность в цитоплазме, ядре или других компартментах клетки.

Способы присоединения терапевтических агентов к векторным молекулам

Ковалентное связывание

В настоящее время широко известными препаратами направленного действия являются ковалентные конъюгаты антител и других векторных белков с токсинами и терапевтическими агентами [155, 166, 371] (рис. 8 А). Иммунотоксины в большинстве случаев представляют собой ковалентные конъюгаты токсинов и антител, специфично узнающих рецепторы, локализованные на поверхности опухолевых клеток-мишеней. При получении химерных токсинов с использованием генно-инженерных технологий токсин и вектор (антитело) экспрессируются в клетках штамма-продуцента в виде химерного белка, компоненты которого также связаны ковалентно.

В случае ковалентного химического связывания противоопухолевого агента с вектором получается стабильный препарат, и поэтому его доставка к клеткам-мишеням может осуществляться более эффективно, чем при использовании нековалентных систем. С другой стороны, биологическая активность химиопрепарата может снижаться или теряться вовсе в результате его ковалентного присоединения к вектору. Обычно стараются сконструировать препарат направленного действия таким образом, чтобы после интернализации он расщеплялся в клетке с освобождением свободного терапевтического агента. Примером таких конструкций могут служить препараты направленного действия, в составе которых вектор и терапевтический агент связаны пептидным линкером, легко расщепляемым протеолитическими ферментами [301, 343, 344]. Механизм действия подобных препаратов заключается в следующем: на первом этапе препарат направленного действия связывается со специфическим рецептором через связывающий домен векторной молекулы. После интернализации препарат, пройдя ряд последовательных стадий клеточной сортировки, попадает в лизосомы, где происходит отделение терапевтического агента от вектора путем протеолитического расщепления пептидного линкера или самого вектора лизосомными ферментами. При наличии достаточной липофильности свободный терапевтический агент может легко пересечь мембрану лизосомы и оказаться в цитоплазме.

Нековалентное связывание

Преимуществом нековалентного связывания является сохранение биологической активности терапевтического агента при формировании его комплекса с вектором. Кроме того, в случае использования ионных взаимодействий для связи терапевтического агента с вектором комплекс может диссоциировать в кислой среде внутриклеточных компартментов, таких как эндосомы и лизосомы. Для транспорта генов в клетку с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза в качестве линкера, связывающего плазмиду и вектор,

широко используют полилизин [243, 320, 369, 374, 376] (рис. 8 Б). В этом случае связь между полилизинном и вектором ковалентная, а между полилизинном и плазмидной ДНК – нековалентная, поэтому возможность повреждения гена при конструировании препарата сводится к минимуму [375, 376].

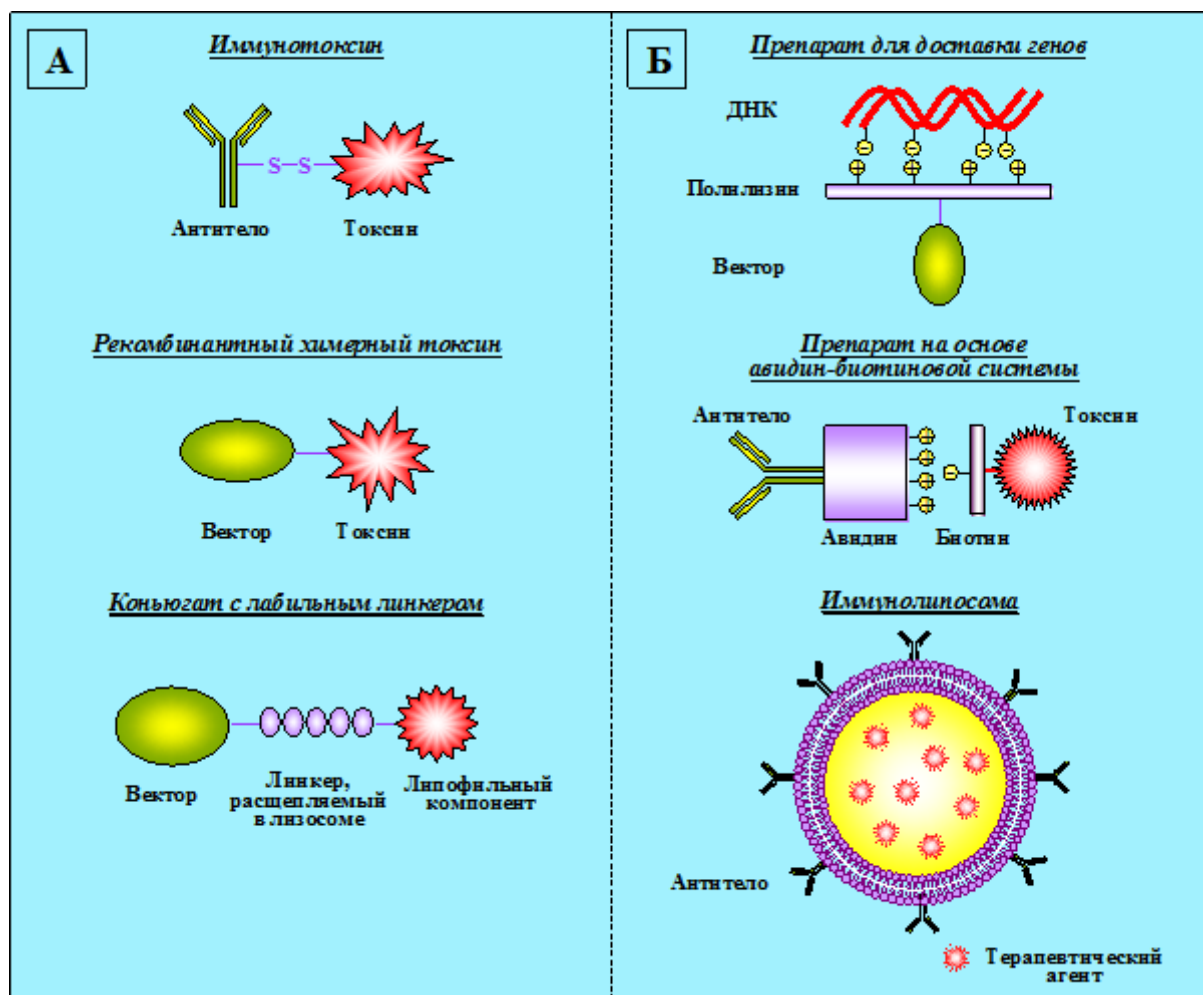


Рис. 8. Препараты направленного действия, полученные путем ковалентного (А) и нековалентного (Б) связывания векторных молекул (антител и других белков) с цитотоксическими и терапевтическими агентами.

Одним из наиболее перспективных подходов к нековалентному связыванию вектора с химиопрепаратом является использование авидин-биотиновой системы (рис. 8 Б). Авидин – катионный белок, обладающий способностью к прочному связыванию с четырьмя молекулами биотина ($K_d=10^{-15}$ М). Представляет интерес стратегия получения препарата направленного действия, в котором конъюгат терапевтического агента с биотином нековалентно связан с комплексом авидин–вектор [382]. Поскольку сродство между авидином и биотином очень высоко, возможно формирование стабильного препарата направленного действия.

Иммунолипосомы интенсивно изучаются многими группами исследователей с целью

установления возможностей их применения для направленной доставки химиопрепаратов [335]. Принцип данного подхода заключается в том, что антитело, находящееся на поверхности липосомы, может узнавать специфический рецептор, в результате чего химиопрепарат, локализованный внутри липосомы, доставляется в клетку путем интернализации липосомного комплекса (рис. 8 Б). Главным фактором, ограничивающим применение данного типа препаратов направленного действия, является их быстрое поглощение клетками ретикуло-эндотелиальной, или макрофагической, системы. Для преодоления этого эффекта конструируют липосомы, поверхность которых покрыта цепями полиэтиленгликоля. Такие «пэгилированные» липосомы не распознаются и не поглощаются макрофагами и отличаются длительным периодом циркуляции в кровотоке [103, 200, 337].

Эффективность препаратов направленного действия

Основные факторы, влияющие на эффективность применения препаратов направленного действия, приведены на рис. 9. Первым из них является конкурентное ингибирование взаимодействия векторного компонента препарата с рецептором при высоких концентрациях эндогенных лигандов. В случае, когда концентрация эндогенного лиганда много выше, чем K_d лиганд-рецепторного комплекса (концентрации лиганда, при которой достигается полунасыщение рецептора), достичь должного уровня связывания с рецептором экзогенного вектора, несущего терапевтический агент, не удастся. Наилучшим примером эндогенного конкурентного ингибитора служит трансферрин, концентрация которого в интерстициальной жидкости может в 5000 раз превышать значение K_d его комплекса с рецептором [239, 240]. Очевидно, что при использовании в составе препаратов направленного действия трансферрина для достижения приемлемого уровня интернализации необходимо создать в интерстициальном пространстве экстремально высокую концентрацию препарата, что с технической точки зрения представляется трудноосуществимым. Отмечены случаи, когда при нормальном статусе организма уровень эндогенного лиганда весьма низок, однако при развитии заболевания он может драматическим образом возрастать и приводить к снижению эффективности терапевтического применения препаратов направленного действия [287].

Вторым важным фактором является специфичность экспрессии рецептора, плотность которого на поверхности клеток-мишеней должна значительно превышать его плотность на поверхности обычных клеток. Необходимо отметить, что известен только один случай, когда определенный вид рецептора экспрессируется почти исключительно одним типом клеток. Это относится к рецептору асиалогликопротеина на гепатоцитах [152, 206]. В связи с тем, что рецепторы векторных молекул присутствуют не только на поверхности клеток-мишеней, при применении препаратов направленного действия всегда необходимо учитывать возможность проявления побочных эффектов в результате поступления препаратов в клетки, не являющиеся объектом терапии.

Третьим важным фактором, который необходимо учитывать при применении

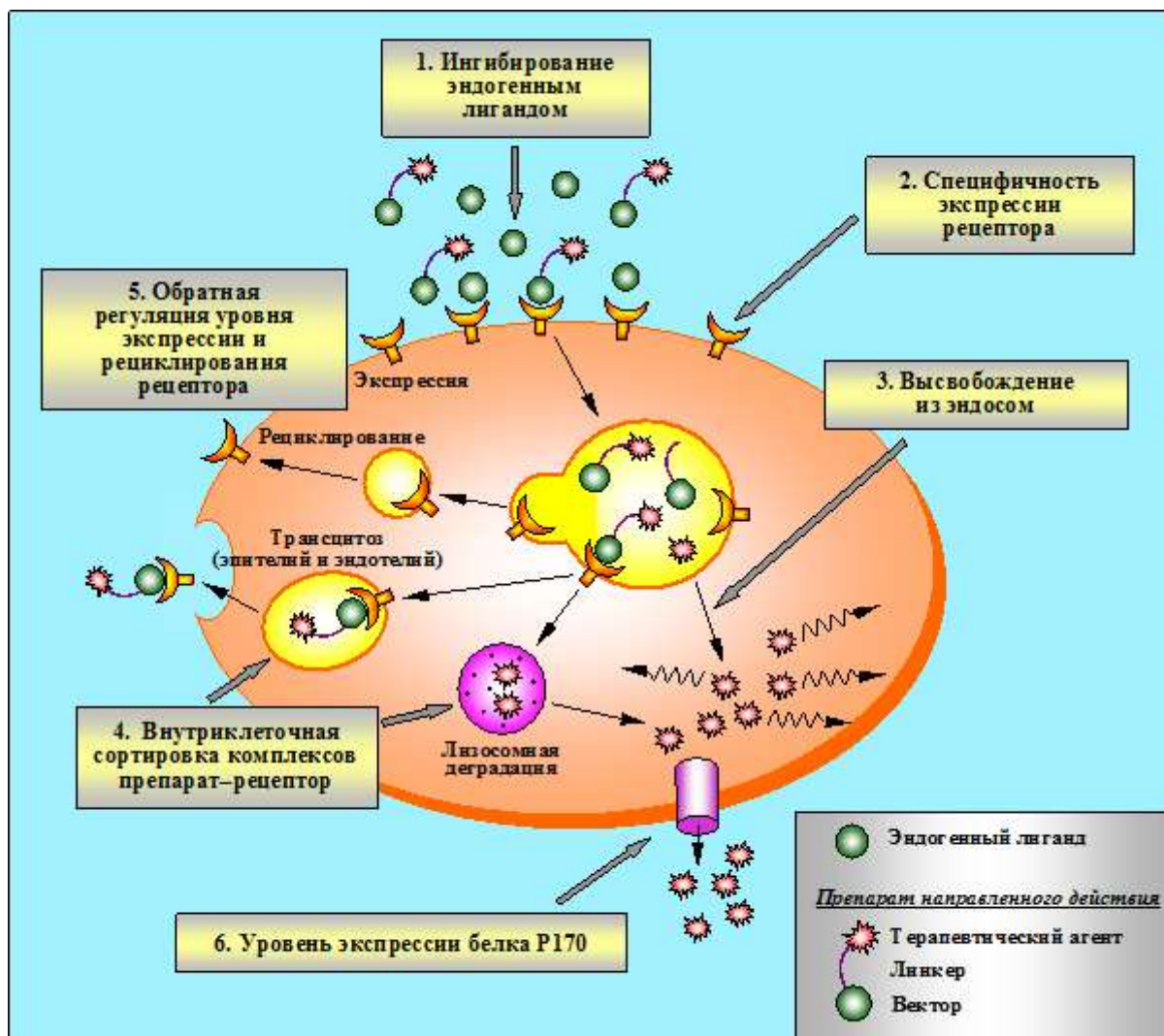


Рис. 9. Критические параметры, влияющие на эффективность применения препаратов направленного действия. При высоких концентрациях эндогенного лиганда наблюдается конкурентное ингибирование связывания препарата с рецептором, приводящее к снижению эффективности его интернализации (1). Рецептор должен быть либо специфичным для клеток-мишеней, либо присутствовать на их поверхности в количестве, значительно превышающем таковое на других клетках (2). В противном случае добиться избирательности действия препарата будет невозможно. Терапевтический агент должен свободно проходить через мембраны внутриклеточных компартментов, иначе он будет изолирован в них и не сможет воздействовать на свои мишени, локализованные в цитоплазме или ядре (3). Эффективность препарата будет низкой, если он будет выбрасываться из клетки в ходе транцитоза или полностью разрушаться в лизосомах (4). При высоких концентрациях препарата число рецепторов на поверхности клетки резко снижается благодаря обратной регуляции уровня экспрессии и рециклирования рецептора («down-регуляция») (5). При высоких уровнях экспрессии мембранного транспортного белка P170 в резистентных клетках происходит энергозависимый выброс терапевтического агента из клетки, резко снижающий эффективность его действия (6).

препаратов направленного действия, является эффективность поступления терапевтического агента из внутриклеточных везикул в цитоплазму. Для проявления терапевтической

активности присутствия препарата в эндосомном компартменте в большинстве случаев оказывается недостаточно. Препарат должен быть транслоцирован в цитоплазму или другие уязвимые к его действию компартменты клетки.

Четвертым фактором является внутриклеточная сортировка интернализованных лиганд-рецепторных комплексов, образованных рецептором и препаратом направленного действия. Существует ряд путей сортировки комплекса после его попадания в эндосомы. После пребывания в эндосомном компартменте комплекс препарата направленного действия с рецептором может быть транслоцирован в лизосомы и подвергнут полной или частичной ферментативной деградации. В условиях кислой среды эндосом возможна диссоциация комплекса с последующим рециклированием рецептора (встраивание в мембрану→интернализация). В ряде случаев наблюдается выброс комплекса препарата направленного действия с рецептором за пределы клетки (транцитоз – процесс, характерный для эпителиальных клеток и эндотелиальных клеток капилляров мозга) [23]. Скорость и направление внутриклеточных транспортных потоков сортировки зависит от типа рецепторов и клеток. Например, в гепатоцитах в случае эндоцитоза ЭФР-рецепторных комплексов преобладающим процессом является лизосомная деградация поступивших в клетку комплексов [136, 324], тогда как в случае трансферрина преобладающим процессом является рециклирование рецепторов [136]. Таким образом, при разработке стратегий применения препаратов направленного действия информация о процессах внутриклеточной сортировки и возможностях влияния на них играет чрезвычайно важную роль. Например, если необходимо обеспечить транспорт терапевтических агентов через эпителиальные клетки, достаточно стимулировать транцитоз. В случае если мишенью действия терапевтического агента, высвобождаемого из эндосом, является цитоплазма, необходимо блокировать внутриклеточные пути сортировки, препятствующие его накоплению в цитоплазме.

Пятым фактором, определяющим эффективность препаратов направленного действия, является обратная регуляция плотности рецепторов на клеточной поверхности. Для обеспечения непрерывной доставки больших количеств терапевтического агента необходимо наличие рецепторов на поверхности клетки. К сожалению, экспозиция рецептора с высокими концентрациями лиганда приводит к адаптивным реакциям, реализуемым путем обратной регуляции уровня рецепторов, снижающей их плотность на клеточной поверхности и скорость поступления терапевтических агентов в клетку [77, 187].

Шестым важным фактором, влияющим на эффективность препаратов направленного действия, является уровень экспрессии транспортного белка Р170, осуществляющего активный выброс из клетки широкого спектра терапевтических агентов. Помимо белка Р170, на эффективность терапии существенное влияние может оказывать многофакторная резистентность клеток-мишеней.

Таким образом, на эффективность препаратов направленного действия может оказывать влияние целый ряд различных факторов (табл. 1). В связи с этим для определения возможностей клинического применения таких препаратов их структурный и химический

Таблица 1. Факторы, оказывающие влияние на фармакокинетику и фармакодинамику препаратов направленного действия

Физиологические факторы
• Ферментативная деградация в крови или на поверхности эндотелиальных клеток • Инактивация в печени и удаление через почки • Связывание с белками плазмы • Связывание с гепарином и элементами внеклеточного матрикса • Связывание с растворимым рецептором • Проницаемость капилляров • Диффузия в интерстициальном пространстве • Степень васкуляризации ткани-мишени • Иммунные реакции
Наличие рецепторов и интенсивность эндоцитоза в тканях
• Число рецепторов на клеточной поверхности • Сродство векторного компонента препарата к рецептору • Конкуренция с эндогенным лигандом • Скорость рецепторопосредованного эндоцитоза • Соотношение скоростей синтеза и деградации рецепторов • Скорость рециклирования рецепторов • Прямая и обратная регуляция плотности рецепторов на поверхности клеток
Компартментализация в клетках-мишенях
• Внутриклеточный трафик эндосом • Расщепление связи между терапевтическим агентом и векторной молекулой в лизосомах • Стабильность терапевтического агента в лизосомах • Эффективность поступления терапевтического агента из эндосом и лизосом в цитоплазму
Условия проведения терапии
• Применяемая доза препарата • Тип ткани-мишени • Способ введения препарата
Свойства препарата направленного действия
• Влияние конъюгирования на рецепторсвязывающие свойства векторной молекулы и активность терапевтического агента • Молярное соотношение терапевтический агент / вектор • Растворимость и биодоступность • Способность преодолевать метаболические и физиологические барьеры • Иммуногенность

дизайн, свойства клеток-мишеней, характер внутриклеточной компартментализации, а также дозы, способ и схемы введения должны учитываться и тщательно подбираться.

Неспецифические механизмы поступления препаратов в клетку

Помимо рецепторопосредованного эндоцитоза, в поступление в клетку препаратов направленного действия могут вносить вклад и другие процессы, такие как фагоцитоз и пиноцитоз. В противоположность другим видам эндоцитоза, не отличающимся избирательностью по отношению к препаратам направленного действия,

рецепторопосредованный эндоцитоз является избирательным механизмом их поступления в клетку. Возможную взаимосвязь эффективности и специфичности препаратов направленного действия рассмотрим на примере противоопухолевых препаратов (рис. 10). При низких концентрациях, не являющихся насыщающими для рецептора, препараты направленного действия поступают в клетку в основном путем избирательного процесса рецепторопосредованного эндоцитоза (рис. 10 А). В присутствии избытка препарата направленного действия в интерстициальной жидкости связывание с рецептором становится насыщающим, и в силу высокой концентрации роль иных механизмов поступления препарата в клетку (например, пиноцитоза) может быть даже более значительной по сравнению с рецепторопосредованным эндоцитозом (рис. 10 Б). Из сказанного следуют четыре важных вывода:

1. Рецепторопосредованная специфичность (соотношение поступления посредством рецепторопосредованного механизма и поступления с помощью других механизмов) может достигать максимума лишь при относительно низких концентрациях лиганда.
2. Рецепторопосредованная специфичность поступления тем выше, чем выше сродство лиганда к рецептору. Лиганды с высоким сродством к рецептору, например, ЭФР ($K_d=10^{-11}$ М), будут поступать в клетку-мишень посредством рецепторопосредованного эндоцитоза при крайне низких концентрациях во внеклеточной среде.
3. Поскольку рецепторопосредованная специфичность достигается при низких концентрациях препаратов направленного действия, входящие в их состав химиопрепараты должны обладать достаточно высокой цитотоксичностью.
4. Рецепторопосредованная специфичность может оказаться крайне низкой, если для достижения адекватного фармакологического эффекта необходима высокая концентрация препарата. Это означает, что в случае применения в составе препарата направленного действия цитотоксического агента будут поражаться не только опухолевые, но и нормальные клетки, поглощающие препарат из среды посредством неспецифических механизмов.

Существуют как минимум три пути удаления препарата направленного действия из внеклеточной среды – рецепторопосредованный эндоцитоз, протекающий в клетках-мишенях, рецепторопосредованный эндоцитоз в нормальных клетках, а также неспецифические механизмы (микропиноцитоз, ферментативная деградация и др.). Для успешного применения препаратов направленного действия в области онкологии необходимо тщательное исследование их фармакокинетических и фармакодинамических характеристик, а также подбор определенных типов опухолей, проявляющих высокую чувствительность к действию конкретного препарата.

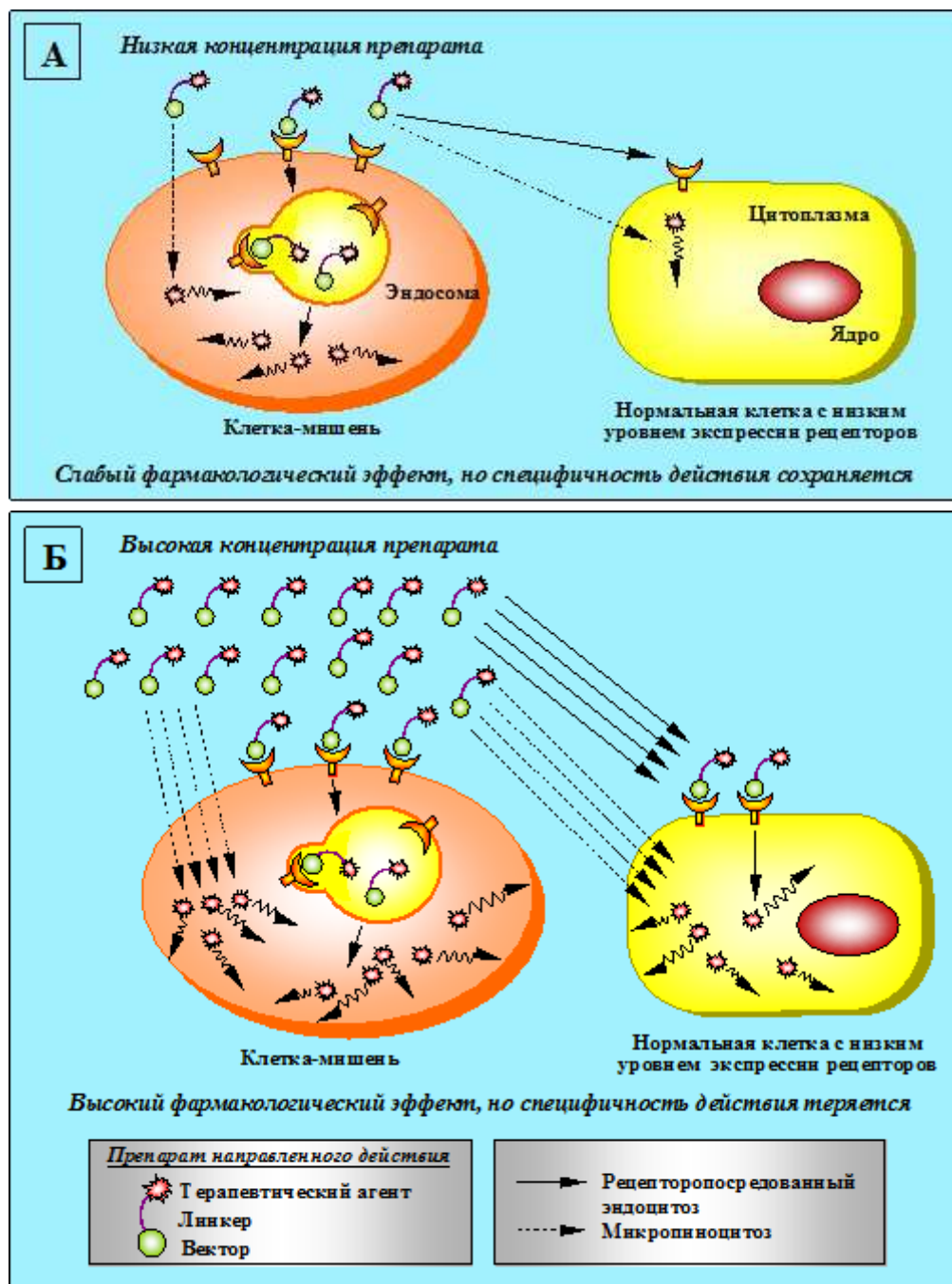


Рис. 10. Взаимосвязь эффективности и специфичности действия противоопухолевых препаратов направленного действия. А. При низких концентрациях препарата направленного действия в интерстициальной жидкости достигается высокая специфичность его доставки путем рецепторопосредованного эндоцитоза, однако при этом может наблюдаться слабый фармакологический эффект. Количество препарата, попадающего в клетку путем пиноцитоза, крайне мало. Б. В присутствии высоких концентраций препарата связывание с рецептором становится насыщающим, и поглощение препарата клеткой путем пиноцитоза может стать преобладающим. Специфичность доставки в данном случае теряется, но может достигаться высокий фармакологический эффект. Потеря специфичности может приводить к поражению нормальных клеток организма и развитию побочных эффектов.

Свойства опухолей

Рак является результатом многоступенчатого процесса мутаций в ключевых регуляторных генах и эпигенетических изменений, которые приводят к нарушению сбалансированной экспрессии генов и проявлению опухолевого фенотипа клеток. Экспрессия доминантных онкогенов способствует злокачественной трансформации, приводит к неконтролируемой пролиферации, нарушению процессов дифференцировки и блокированию апоптоза трансформированных клеток. Гены-супрессоры, кодирующие факторы, подавляющие пролиферацию, в трансформированных клетках часто являются рецессивными и не оказывают влияния на злокачественное перерождение ткани (рис. 11).



Рис. 11. Роль стимулирующих и супрессорных генов в опухолевом процессе. В трансформированных клетках признаки протоонкогенов, подавляющих неконтролируемую пролиферацию, часто оказываются рецессивными по отношению к соответствующим онкогенам и не оказывают влияния на злокачественное перерождение ткани. Протоонкогены, ответственные за нормальную регуляцию пролиферации, также оказываются рецессивными по отношению к онкогенам, экспрессия которых приводит к гиперпролиферации трансформированных клеток.

В процессе микроэволюции раковые клетки приобретают ряд отличительных особенностей (рис. 12), важнейшей из которых является способность избегать перехода к постмитотическому состоянию покоя и терминальной дифференцировке. Поддержание стабильности состояния тканей обеспечивается посредством жесткого контроля со стороны

регуляторных систем организма над экспрессией факторов роста, поэтому для достижения пролиферативной автономии раковые клетки вынуждены либо переключиться на аутокринную продукцию митогенных факторов, без которых невозможна активная пролиферация, либо приобрести активирующие мутации в генах, регулирующих митогенные сигнальные каскады. В качестве примеров можно привести хорошо известные активирующие мутации гена, кодирующего белок Ras, или мутации, вызывающие гиперэкспрессию фактора транскрипции с-Мус. К неконтролируемой пролиферации раковых клеток может также привести прямая потеря контроля над системой регуляции клеточного цикла [123]. При нарушении в системе блокирования митогенных сигналов наблюдается повышение уровня экспрессии клеточных циклинов, которые в комплексе с циклинзависимыми киназами (CDK) вызывают гиперфосфорилирование белков Rb. Необходимые для активации генов, ответственных за прохождение клеточного цикла, факторы транскрипции E2F в покоящихся клетках находятся в виде неактивных комплексов

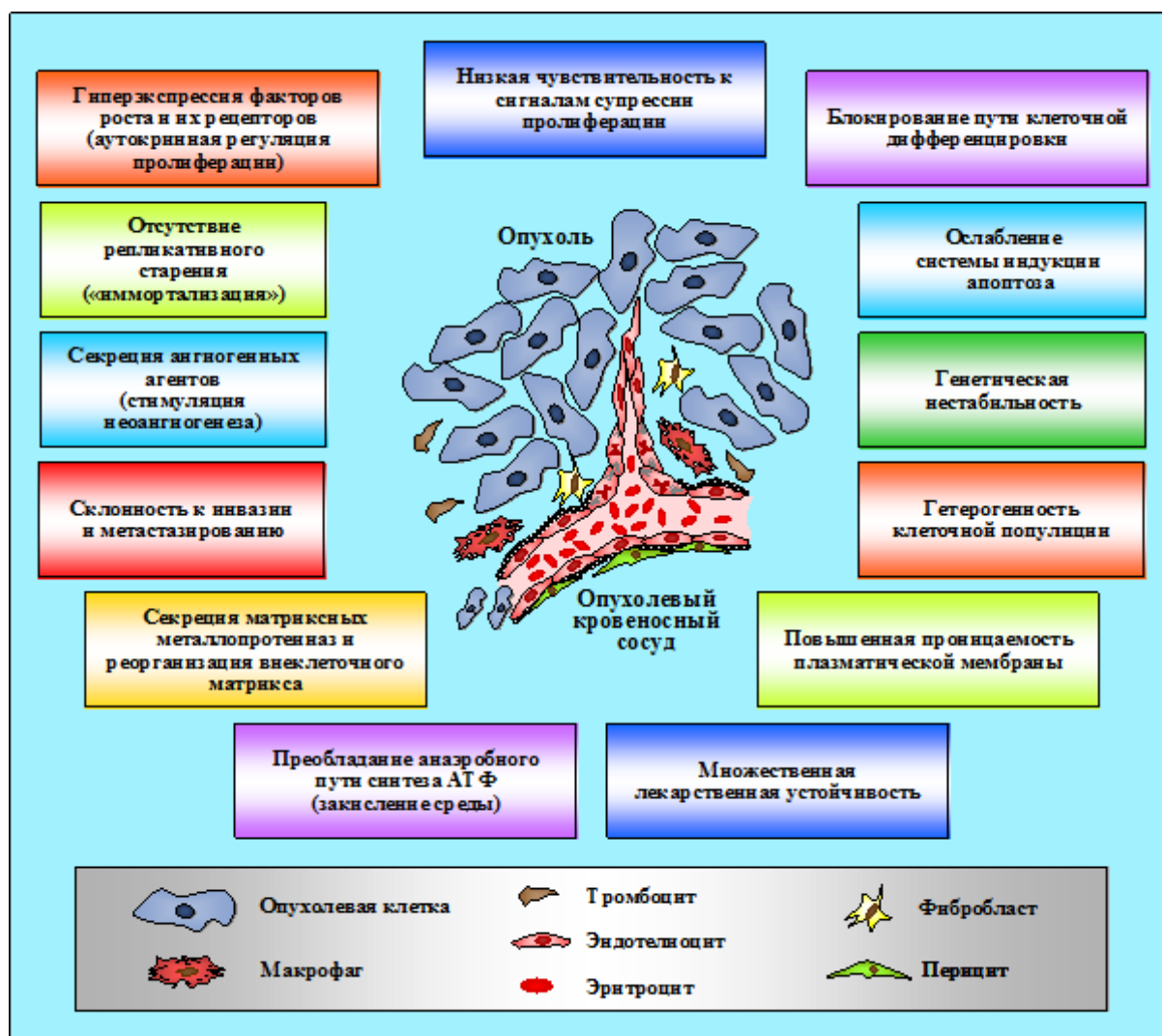


Рис. 12. Некоторые отличительные особенности опухолевых клеток.

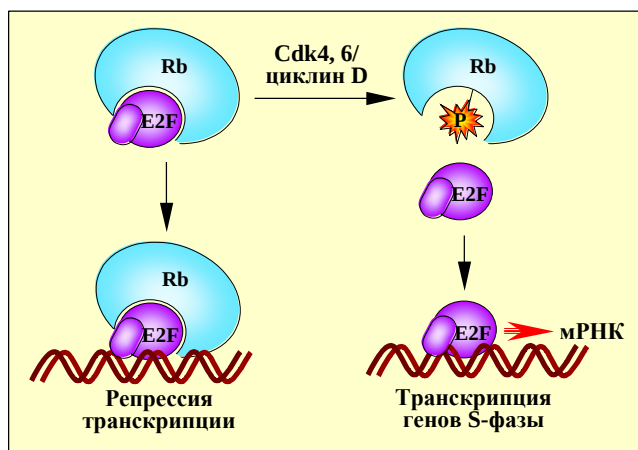


Рис. 13. Регуляция клеточного цикла белком Rb и фактором транскрипции E2F.

с дефосфоформами белков Rb (рис. 13). В результате фосфорилирования комплекс Rb–E2F распадается, факторы E2F высвобождаются и индуцируют экспрессию генов, играющих ключевую роль в прохождении клеточного цикла. Нарушения в регуляции нормального прохождения клеточного цикла, которые могут происходить не только из-за снижения функциональной активности белков семейства Rb или ингибиторов CDK, но и вследствие аномального повышения уровней экспрессии циклинов и

циклин-зависимых киназ, по-видимому, являются важнейшими условиями развития опухоли, и такие нарушения отмечаются в большинстве из исследованных на этот предмет опухолей человека [22].

В последние 20 лет молекулярная патология рака получила широкое признание и сейчас представляет собой быстро расширяющееся поле исследований, направленных на открытие новых мишеней для создаваемых лекарств. Несмотря на несколько десятилетий интенсивных лабораторных и клинических исследований, долгосрочные перспективы раковых больных с агрессивной формой заболевания остаются удручающими. Главная проблема в борьбе с раковыми клетками заключается в том, что, за редким исключением, они не несут молекулярных мишеней для химиопрепаратов, которые являлись бы полностью чужеродными или отличными от представленных в нормальных клетках здорового организма. При этом опухолевые клетки все же отличаются от нормальных, в частности, высоким уровнем метаболической активности и повышенной проницаемостью мембран, поэтому подавляющее большинство применяемых в клинике химиопрепаратов представлено цитотоксиками, отличающимися высокими уровнями накопления в опухолевой ткани. Однако у больных с тяжелыми онкологическими заболеваниями разрешенные к клиническому применению химиопрепараты чаще всего вызывают лишь кратковременную ремиссию, за которой следует возобновление прогрессии опухолей, во многих случаях характеризующихся еще большей биологической агрессивностью и устойчивостью к терапии. Многие случаи низкой эффективности терапии традиционными химиопрепаратами обусловлены как дозолимитирующим цитотоксическим действием на популяцию пролиферирующих нормальных клеток, так и высокой общей или органоспецифической токсичностью. Необходимость учета этих факторов приводит к неизбежному снижению терапевтических доз вводимых препаратов до такого низкого порогового значения, при котором полного уничтожения раковых клеток не достигается. Это может приводить к выработке устойчивости к препарату, отбору еще более агрессивных популяций опухолевых клеток, склонных к метастазированию, и, как следствие, неблагоприятному прогнозу

течения заболевания. Следует отметить, что разработка противоопухолевых химиопрепаратов посредством модификации уже существующих или скрининга новых не дает гарантии на успех, и новые препараты нередко мало чем отличаются от предшествующих. В последнее время затраты на фармацевтические исследования в США ежегодно увеличивались на 40%, а число одобренных новых лекарств снижалось на 50%. Компаниям требовалось затратить как минимум 500 миллионов долларов и по меньшей мере 10 лет для того, чтобы вывести на рынок новое лекарство, причем большинство лекарств отбраковывалось на стадии разработки.

Таким образом, современная химиотерапия имеет много недостатков, связанных прежде всего с дозолимитирующими токсическими побочными эффектами. За последние несколько десятилетий многими научными коллективами были предприняты усилия по изменению сложившегося положения дел, которые привели к созданию качественно новых препаратов, среди которых препараты направленного действия являются одними из наиболее перспективных. В настоящее время разработаны и продолжают активно разрабатываться подходы к направленной доставке цитотоксических веществ в раковые клетки, использующие конъюгаты этих веществ с различными векторными молекулами, которые избирательно накапливаются в опухолях [138]. В качестве таких векторных молекул могут быть использованы антитела, пептиды или целые белки. Стратегии направленной доставки преследуют две главные цели: во-первых – максимально защитить нормальную ткань от воздействия противоопухолевых препаратов, и во-вторых – добиться проявления специфичного для опухоли механизма активации цитотоксического вещества, входящего в состав препарата направленного действия.

Доставку химиопрепаратов в опухолевые клетки нередко подразделяют на активную и пассивную, причем пассивная предполагает накопление лекарства вследствие действия физико-химических или фармакологических факторов, тогда как активная направленная доставка обусловлена специфическим взаимодействием между системой доставки и компонентами клеток или тканей. Терапия рака с помощью традиционных лекарственных средств осуществляется преимущественно с применением цитотоксических препаратов, которые убивают клетки вместо того, чтобы оказывать постепенное фармакологическое действие за счет коррекции внутриклеточных процессов и влияния на межклеточные взаимодействия. Как уже отмечалось, большинство традиционных противоопухолевых препаратов было разработано исходя из известной способности к интенсивной пролиферации, высокой скорости метаболизма и повышенной проницаемости мембран опухолевых клеток по сравнению с нормальными, что обуславливает более высокие уровни накопления препаратов в опухолевой ткани. В целом это действительно так, однако проблема состоит в том, что разница между активностью препарата по отношению к опухолевой и нормальной тканям часто настолько мала, что между концентрацией, вызывающей гибель всех опухолевых клеток, и концентрацией, ведущей к серьезным повреждениям нормальной ткани, остается лишь небольшое «окно». Очевидно, что возможность повышения адресности доставки препарата к клеткам-мишеням и

сопутствующее уменьшение количества препарата, поступающего в нормальные ткани, привели бы к сокращению числа опасных для жизни побочных эффектов и значительному прогрессу в терапии рака. Открытие опухолевых антигенов явилось мощным стимулом для активных теоретических и практических исследований в этой области. Однако вскоре стало ясно, что в большинстве своем предложенные для препаратов направленного действия мишени относились к антигенам, различие в уровнях экспрессии которых опухолевой и нормальной тканями носит лишь количественный характер. В связи с этим перед исследователями возник вопрос о том, может ли такая разница в уровнях экспрессии антигена быть достаточной для проведения эффективной противоопухолевой терапии с помощью препаратов направленного действия. Чтобы ответить на него, необходимо, в первую очередь, определить характерные различия между нормальными и раковыми клетками, которые могут быть использованы для выработки стратегий создания новых противоопухолевых препаратов. Прежде всего следует отметить, что молекулы клеточной поверхности, распознаваемые векторным компонентом препарата направленного действия, не обязательно должны быть специфичными для опухоли антигенами (например, онкобелками), а могут являться обычными белками и рецепторами, характерными для нормальных тканей. В последнем случае для обеспечения избирательности действия препаратов уровень экспрессии этих белков в опухолевой ткани должен значительно, часто на порядки, превышать таковой уровень в нормальных тканях. В идеальном случае молекула-мишень клеточной поверхности должна обладать следующими свойствами: являться уникальной молекулой, экспрессируемой только в опухолевой ткани, проявлять высокое сродство к векторной молекуле, обеспечивать высокий уровень интернализации препарата, характеризоваться однородностью экспрессии на поверхности опухолевых клеток всей популяции, экспрессироваться в опухолях всех больных с одинаковым типом рака, не секретироваться в кровь больных. К сожалению, как показали многолетние исследования, идеальных мишеней не существует, и поэтому препараты направленного действия разрабатывают, исходя из наличия у молекулы-мишени хотя бы части требуемых свойств.

Для получения препарата направленного действия необходимо химически соединить векторный компонент и цитотоксическое вещество, то есть получить их конъюгат. В отличие от свободного цитотоксика конъюгат не способен проникать в клетки благодаря векторному компоненту, для которого клеточные мембраны непроницаемы. Таким образом, цитотоксическое вещество в составе конъюгата временно теряет свою токсичность для клеток и не проявляет ее до тех пор, пока конъюгат не достигнет своей мишени. Оказавшись в интерстициальной жидкости опухолевой ткани, конъюгат за счет векторного компонента связывается с рецептором поверхности опухолевых клеток и проникает в них в ходе рецепторопосредованного эндоцитоза. В эндосомных или лизосомных компартментах цитотоксический компонент высвобождается из состава конъюгата, попадает в цитоплазму и проявляет фармакологическую активность. Таким образом, конъюгированные препараты можно рассматривать как пролекарства, активируемые опухолью.

Ранее при конструировании препаратов направленного действия в качестве

векторного компонента широко использовались моноклональные антитела, однако в конце концов стало ясно, что большинство видов антител связывается с антигенами, которые лишь преимущественно, но не исключительно, экспрессируются на поверхности опухолевых клеток, поэтому антитела также связываются, хотя и в меньшей степени, с клетками нормальных тканей. К сожалению, во многих случаях антитела не оправдывают надежд на их применение в составе препаратов направленного действия в качестве «магической пули», поскольку они не всегда обеспечивают высокие уровни интернализации и накопления терапевтических агентов в опухолевой ткани. Исследование возможностей применения небольших фрагментов антител показало, что они обладают высокой скоростью клиренса и в некоторых случаях неспособны транспортировать достаточное количество активного лекарства.

В настоящее время для использования в качестве векторных компонентов все большее внимание привлекают различные цитокины и онкофетальные белки. В частности, широко изучается эпидермальный фактор роста, стабильный белок, обладающий небольшой мол. массой и высоким сродством к рецепторам, в большом количестве присутствующим на поверхности опухолевых клеток. Некоторые другие белки с небольшой мол. массой, например, трансформирующий фактор роста α и лактоферрин, также связываются преимущественно с опухолевыми мишенями и могут быть успешно использованы в качестве векторных молекул при конструировании препаратов направленного действия. Весьма перспективным является использование в качестве вектора и альфа-фетопротеина – онкофетального белка, рецептор которого избирательно экспрессируется в различных типах опухолей и практически отсутствует на поверхности нормальных тканей взрослого человека.

Для создания эффективных противоопухолевых препаратов направленного действия необходим тщательный подбор составляющих их компонентов, кросс-линкеров («сшивающих» агентов), условий конъюгирования, а также четкое определение типа рецепторов и опухолевых клеток, на которые будет действовать препарат. Рациональное использование стратегий получения препаратов в конечном итоге должно обеспечить их стабильность в кровотоке, низкую токсичность для нормальных тканей, а также высокую эффективность интернализации и высвобождения действующих компонентов в опухолевых клетках.

Антигены поверхности опухолевых клеток

В период становления концепции направленной доставки терапевтических агентов в клетки-мишени наиболее широко исследовались иммуноконъюгаты, представляющие собой конъюгаты токсинов с антителами (иммунотоксины), узнающими антигены, локализованные на поверхности опухолевых клеток. Иммунотоксины вводились в кровь лабораторным животным с привитыми солидными опухолями, и по терапевтическому эффекту оценивались перспективы их клинического применения. Большинство опухолевых антигенов, используемых в качестве мишеней для иммунотоксинов, экспрессируется и нормальными

клетками, но в значительно меньших количествах. По существу эти антигены не являются специфичными для опухоли, и поэтому нормальные ткани, хотя и в значительно меньшей степени, могут подвергаться действию иммунотоксина. Однако благодаря высокому содержанию антигена на поверхности опухолевых клеток наибольшее количество препарата в ходе рецепторопосредованного эндоцитоза оказывается в опухолевых клетках, что позволяет говорить не о специфичности, а об избирательности его действия. Одним из первых высокоспецифичных опухолевых маркеров, обнаруженных учеными, был раково-эмбриональный антиген, относящийся к группе молекул клеточной адгезии. В дальнейшем было показано, что мутантная форма опухолевого супрессора p53 также является специфичным для опухоли антигеном, узнаваемым Т-клетками в составе главного комплекса гистосовместимости. Было также обнаружено, что некоторые белки теплового шока гиперэкспрессируются при ряде видов рака (считается, что они могут привлекать НК-клетки).

На пути к эффективному использованию опухолевых антигенов в качестве мишеней для препаратов направленного действия стоят две существенные проблемы – гетерогенность структуры и «сброс» антигенов. Гетерогенность структуры антигенов может быть следствием генетической нестабильности клеток в некротической области опухолевой ткани. Например, конкретный антиген – гликопротеин, экспрессируемый опухолевой тканью и являющийся мишенью для иммунотоксина, – может иметь разную степень гликозилирования у разных групп клеток популяции. Если мишенью является белковый рецептор, клетки разнородной опухолевой популяции могут нести разные изоформы этих рецепторов, различающиеся, в свою очередь, сродством к векторному компоненту иммунотоксина. Такая гетерогенность приводит к общему снижению сродства векторного компонента к антигену. В результате терапевтическая активность препарата значительно снижается. Важным свойством опухолевых клеток является также «сброс» антигенов с клеточной поверхности, который связан с неконтролируемым отделением различных макромолекул от поверхности опухолевых клеток. Такие «сброшенные» антигены, присутствующие в крови или интерстициальной жидкости, способны конкурировать за связывание иммунотоксинов с антигенами поверхности опухолевых клеток. Следствием этого является снижение эффективности направленной доставки за счет образования неактивных комплексов конъюгата с антигеном, которые быстро удаляются из организма.

Эффективность интернализации

Скорость поступления препаратов направленного действия в опухолевые клетки во многом определяется эффективностью процесса рецепторопосредованного эндоцитоза и зависит от количества рецепторов (антигенов), присутствующих на поверхности клетки, концентрации эндогенного лиганда в интерстициальной жидкости, скорости интернализации лиганд-рецепторных комплексов и рециклирования рецепторов, процесса обратной регуляции плотности рецепторов на поверхности клетки, запускаемого при повышении

концентрации лиганда, и т.п. Как правило, опухолевые клетки отличаются высокой плотностью рецепторов на поверхности плазматической мембраны и активным поглощением макромолекул из окружающей среды путем рецепторопосредованного эндоцитоза.

Проницаемость опухолевых кровеносных сосудов

Прогрессия опухоли тесно связана с опухолевым ангиогенезом – процессом формирования новых кровеносных сосудов из предсуществующих. Микроопухоли секретируют ангиогенные факторы, диффундирующие к близлежащим сосудам и вызывающие формирование сосудистых ответвлений, растущих в направлении опухоли (рис. 14). Достигшие опухоли капилляры быстро прорастают опухолевую ткань, принося опухолевым клеткам кислород и нутриенты. С этого момента опухоль начинает бурно прогрессировать, опухолевые клетки проникают в кровеносные сосуды и рассеиваются по организму в виде регионарных метастазов.

В силу патологического влияния опухоли на предсуществующие и формирующиеся кровеносные сосуды, осуществляемого путем активной секреции ангиогенных факторов, опухолевые сосуды значительно отличаются от нормальных и характеризуются рядом особенностей. Стимуляция эндотелия опухолью сопровождается появлением множественных цитоплазматических выростов на поверхности эндотелиоцитов, а также характерными внутриклеточными изменениями, определяющими их синтетический фенотип: в цитоплазме обнаруживается множество митохондрий и рибосом, резко увеличивается поверхность гранулярного эндоплазматического ретикулаума [174]. Важной особенностью сосудов опухолевой ткани является их повышенная проницаемость, обусловленная активной секрецией опухолевыми клетками сильных вазодилататоров – оксида азота (NO) и VEGF [72, 80, 102]. В результате совместного действия NO и VEGF между эндотелиальными клетками образуются широкие промежутки, заполненные микротромбами. Базальная мембрана, выстилающая снаружи эндотелий, приобретает обширные разрывы. Эти изменения в предсуществующих кровеносных сосудах, инфильтрующей опухолевую ткань, сопровождаются плазморрагиями, гиалинозом стенок и внутристеночными кровоизлияниями. Первоначальная дестабилизация кровеносных сосудов усугубляется дальнейшей фрагментацией базальной мембраны, представляющей собой пористую, полупроницаемую оболочку, в состав которой входят ламинин, коллагены (IV и V типа), фибронектин и другие гликопротеины. В конце концов, базальная мембрана в дилатированных материнских сосудах либо исчезает, либо становится фрагментарной и многослойной.

В процессе ангиогенеза аномально быстро пролиферирующие эндотелиальные клетки в опухолях формируют крупные и широкие сосуды с медленным кровотоком, которые практически не содержат перicyтов и адвентициальных клеток в составе сосудистой стенки. Стенки новообразованных капилляров лишь частично выстланы эндотелием со слабо развитыми межэндотелиальными контактами [137]. Для таких капилляров характерен

высокий уровень фильтрации плазмы крови в интерстициальное пространство опухолевой ткани. Микроциркуляторное русло опухоли отличается хаотичным ростом и организацией, что связано с существованием множественных очагов васкуляризации в опухолевой ткани, характеризующихся разной интенсивностью секреции ангиогенных факторов. Поскольку

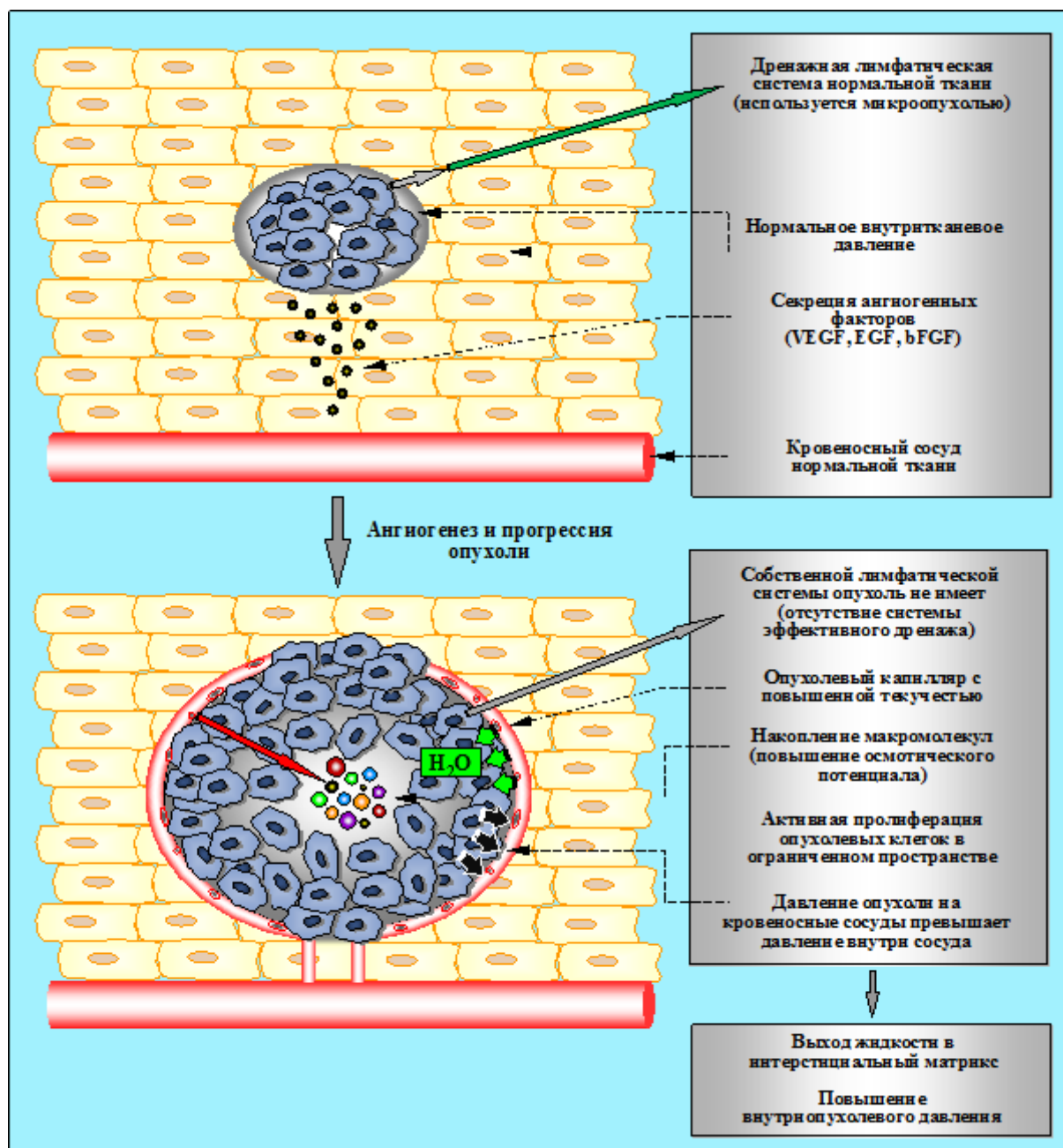


Рис. 14. Прогрессия опухоли и факторы, вызывающие повышение внутриопухолевого давления. Микроопухоли часто оказываются в условиях гипоксии, поскольку составляющие их клетки активно метаболизируют и делятся в ограниченном пространстве. Именно условие гипоксии является фактором, индуцирующим секрецию ангиогенных агентов. Прорастание опухоли кровеносными сосудами обеспечивает приток кислорода и питательных веществ и вызывает ее бурную прогрессию. Опухолевые клетки проникают в кровеносные сосуды, рассеиваются по организму и формируют регионарные метастазы.

рост сосудов к центру опухоли часто наталкивается на зоны некроза, наблюдается наличие обширных бессосудистых зон, располагающихся вслед за хорошо васкуляризованными. Таким образом, одной из характерных особенностей опухолевых сосудов является неравномерность их распределения в опухолевой ткани (рис. 15).

В крупных солидных опухолях развития полноценно функционирующей лимфатической сети обычно не происходит, поэтому система эффективного дренажа отсутствует. В результате создается эффект «просеивания», при котором крупные молекулы оказываются «пойманными» опухолевой тканью (рис. 14).

В силу влияния целого ряда факторов опухоли характеризуются равномерно повышенным внутритканевым давлением, которое на периферии опухоли резко падает и приближается к нормальному. Внутриопухолевое давление может в 5 и более раз превышать давление в нормальной ткани. Давление в опухолевых капиллярах также выше, чем в нормальных, и приближается к давлению в межклеточном пространстве опухоли, что

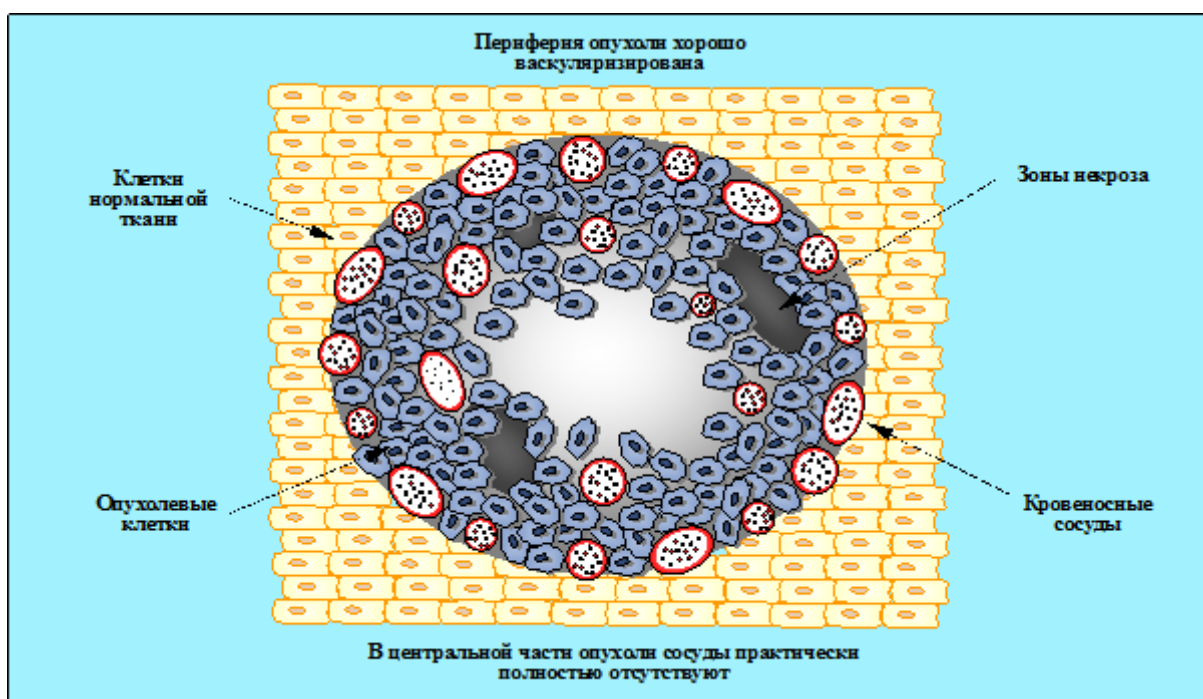


Рис. 15. Неоднородность васкуляризации опухолевой ткани. Кровеносная сеть опухоли дезорганизована. Отдельные области опухоли васкуляризованы неравномерно – максимальная плотность сосудов наблюдается на периферии опухоли, тогда как ее центральная часть васкуляризована слабо. В опухолевой ткани присутствуют обширные зоны некроза. Опухолевые сосуды обладают повышенной проницаемостью, обусловленной высоким уровнем продукции опухолевыми клетками вазодилататоров – NO и VEGF. Базальная мембрана сосудов часто фрагментарна и многослойна. Крупные опухолевые сосуды практически лишены перicyтов и адвентициальных клеток в составе сосудистой стенки, а стенки капилляров лишь частично выстланы эндотелием. Сосуды солидных опухолей отличаются избыточным количеством и ветвлением, хаотичным ростом в непредсказуемых направлениях. Сосуды чрезвычайно извилисты, переплетены друг с другом, образуют хаотичные клубки. Для опухолевых сосудов характерен медленный кровоток и аномально высокая вязкость крови, что является фактором резкого снижения эффективности поступления химиопрепаратов в опухолевую ткань.

препятствует выходу химиопрепаратов из капилляров (рис. 16). В периферической области опухоли высвобождение химиопрепаратов происходит гораздо более активно, поскольку эта область сильно васкуляризирована, и давление в периферических сосудах близко к нормальному (рис. 16).

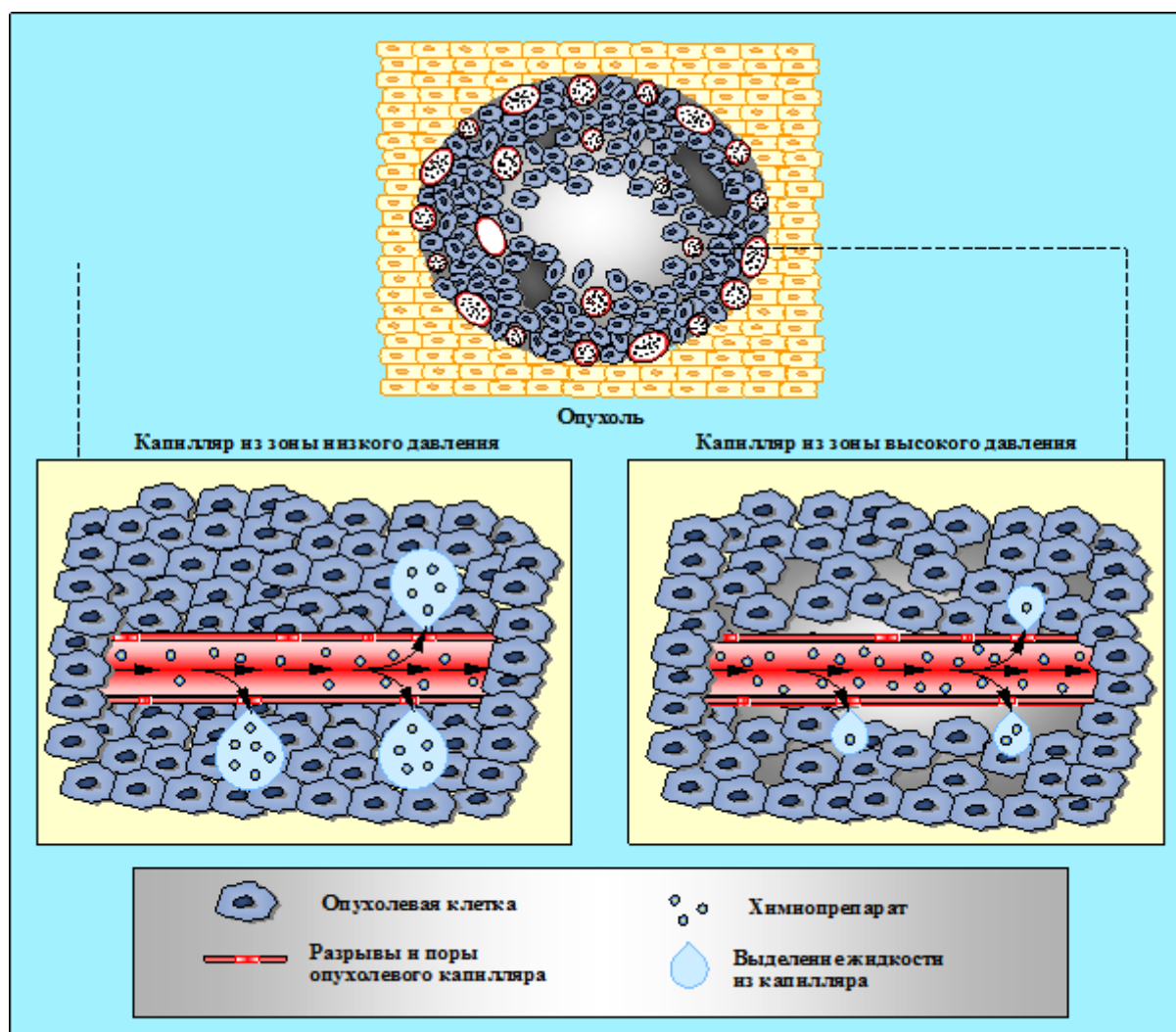


Рис. 16. Причины низкой эффективности поступления химиопрепаратов в опухолевую ткань. Давление в межклеточном матриксе опухоли равномерно повышенное, за исключением периферии, где оно резко падает и приближается к нормальному. Давление внутри опухолей может в 5 раз и более превышать давление в нормальной ткани. Давление в опухолевых капиллярах выше, чем в нормальных, и близко к значению давления в межклеточном матриксе. В периферических сосудах давление близко к нормальному. Высокое давление во внутренней зоне опухоли сильно затрудняет поступление химиопрепаратов из кровотока в матриксе, поскольку крупные молекулы перемещаются по сосудам и «выдавливаются» в ткань путем вынужденной конвекции, перемещаясь в токе жидкости от зон с более высоким давлением в зоны с более низким. В периферической зоне опухоли давление в сосудах выше, чем в межклеточном матриксе, и поэтому жидкость в крови, нагруженная молекулами химиопрепарата, просачивается в межклеточное пространство. Внутри опухоли давление примерно равно давлению в сосудах, что приводит к прекращению конвекции и резкому снижению эффективности выхода химиопрепарата в межклеточное пространство.

Сравнительно недавно был описан процесс формирования капилляроподобных сосудистых структур, выстланных опухолевыми клетками, получивший название сосудистой мимикрии [20]. Первоначально это явление было обнаружено в ткани человеческой меланомы, однако позднее гистологический анализ образцов тканей больных раком яичника и молочной железы подтвердил, что сосудистая мимикрия характерна и для этих опухолей [92]. С помощью ПЦР-анализа фрагментов опухолевой ткани больных раком молочной железы с гистологически подтвержденным наличием явления сосудистой мимикрии была продемонстрирована активная экспрессия в зоне «ложных» сосудов (каналов) медиаторов ангиогенеза – рецепторов VEGF и ангиопоэтинов. Впоследствии было показано, что формируемые опухолью каналы способны транспортировать кровь без привлечения эндотелиальных клеток, причем опухолевые клетки, выстилающие канал, экспрессируют эндотелиальные белки, включая VE-кадгерин и рецепторы эфринов [306].

Разрушение опухолевой кровеносной сети с помощью препаратов направленного действия может служить эффективным инструментом подавления опухолевого роста и метастазирования. К белкам-мишеням, пригодным для направленной доставки химиопрепаратов и экспрессируемым в эндотелии опухолевых сосудов, относятся молекулы клеточной адгезии (интегрины (рис. 17)) и рецепторы факторов роста (VEGF, EGF, bFGF). Поскольку опухолевые сосуды находятся в состоянии постоянного ремоделирования, для обеспечения их выживания необходим фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), поэтому блокируя его секрецию или внутриклеточную систему каскадной передачи регуляторного сигнала, можно также вызвать деструкцию опухолевой кровеносной сети и индуцировать апоптотическую гибель опухолевых клеток.

Метастазирование

Ангиогенез является процессом, резко повышающим биологическую агрессивность опухоли, поскольку приток кислорода и нутриентов приводит к бурному росту опухолевой ткани и проявлению ее высокой инвазивности (способности проникать в близлежащие ткани и кровяное русло). Кроме того, наличие собственной кровеносной сети позволяет опухолевым клеткам распространяться по организму с током крови и формировать в дистальных органах вторичные опухоли, или метастазы, значительно снижающие шансы онкобольных на выживание (рис. 18). Первоначально образовавшаяся в нормальной ткани опухоль (этап 1) благодаря инвазивной способности прорастает в окружающую ткань и разрушает базальную мембрану (этап 2). Продуцируя ангиогенные факторы, опухоль индуцирует ангиогенез, в результате чего формируются опухолевые кровеносные сосуды (этап 3). Проникая в кровеносный сосуд (интравазия), опухолевые клетки разносятся с током крови по организму (этап 4). Благодаря экспрессии адгезионных молекул опухолевая клетка прикрепляется к стенке кровеносного сосуда дистального органа (этап 5). Далее опухолевая клетка разрушает базальную мембрану сосуда и проникает в ткань (экстравазия, этап 6), где мигрирует к артериоле. Пролиферация опухолевых клеток приводит к образованию малых неваскуляризированных вторичных опухолей, или микрометастазов (этап 7).

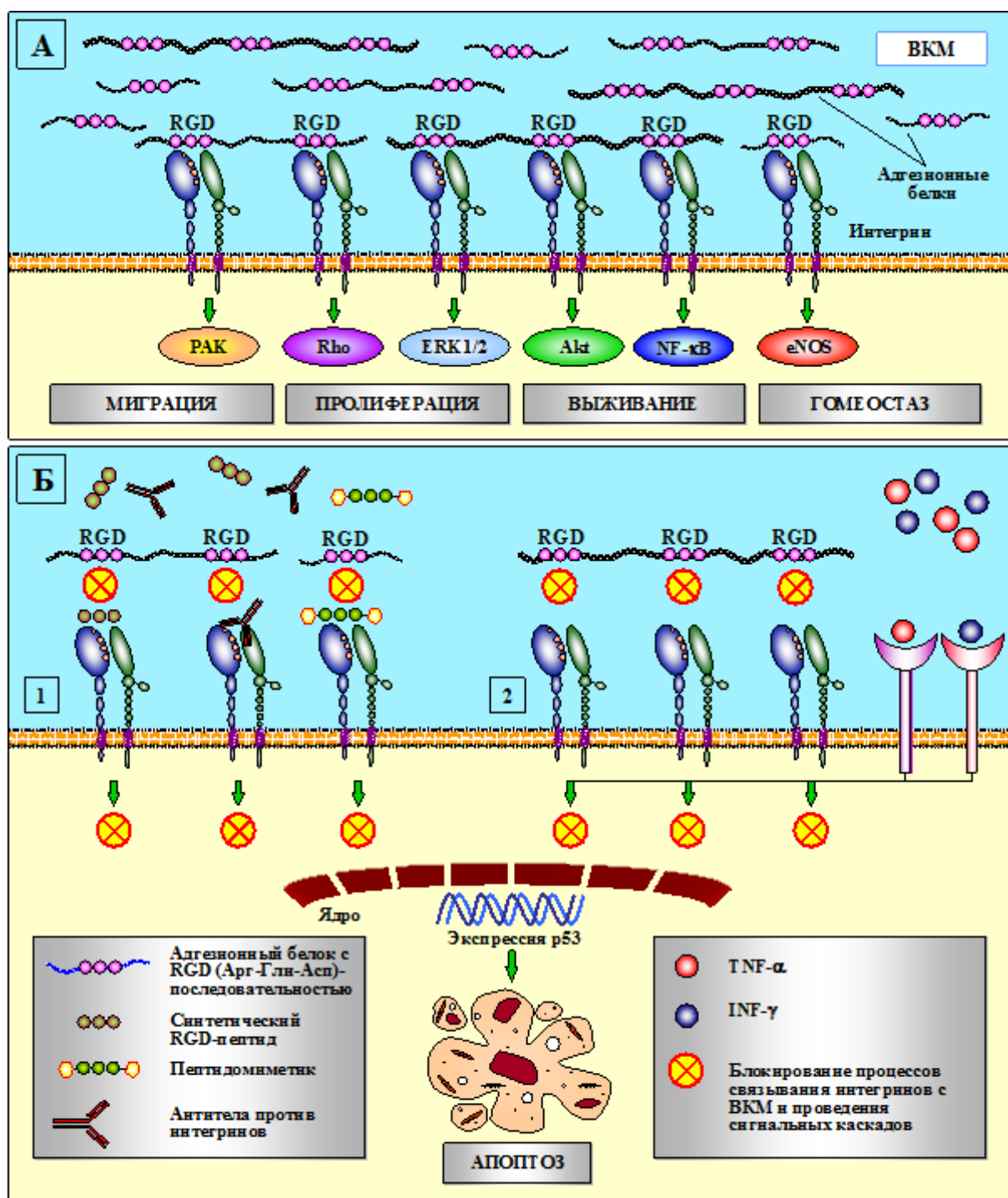


Рис. 17. Индукция апоптоза эндотелиальных клеток, вызванная блокированием интегринов. А. Белки внеклеточного матрикса (ламинин, фибронектин, витронектин и др.), содержащие RGD-последовательность, участвуют в регуляции ангиогенной активности эндотелиальных клеток посредством связывания с интегринными. Б. Апоптоз эндотелиальных клеток, вызванный блокированием сайтов связывания интегринов антителами, RGD-пептидами и пептидомиметиками (1). Инактивация интегринов, вызванная действием цитокинов TNF-α и INF-γ, приводит к блокированию взаимодействия интегринов с белками внеклеточного матрикса и индукции апоптоза эндотелиальных клеток (2).

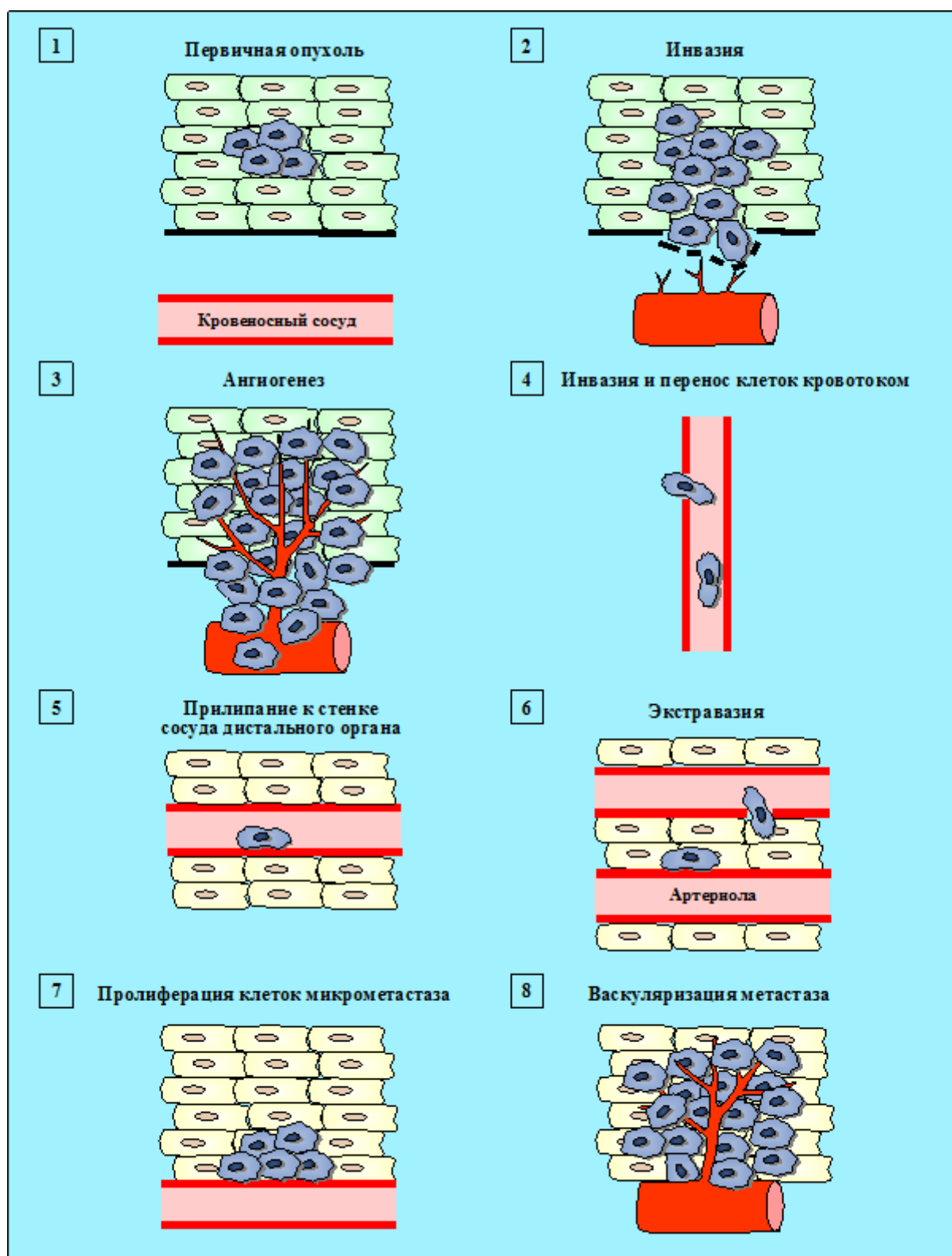


Рис. 18. Стадии метастазирования.

Микрометастазы инициируют ангиогенез и превращаются в прогрессирующие вторичные опухоли, или метастазы (этап 8). Таким образом, ангиогенез обуславливает распространение опухолей по всему организму.

По статистике в развитых странах причиной ~20% регистрируемых случаев смерти является рак. Поскольку васкуляризация приводит к быстрой прогрессии опухоли, особую актуальность приобретает поиск и применение антиангиогенных агентов (например, ангиостатина и эндостатина (рис. 19, 20)), способных снизить риск заболевания населения раком и увеличить эффективность терапии злокачественных новообразований за счет подавления развития или избирательного разрушения опухолевых кровеносных сосудов. Для блокирования процессов опухолевого ангиогенеза и метастазирования также перспективным представляется применение антиангиогенных агентов в составе препаратов направленного действия.

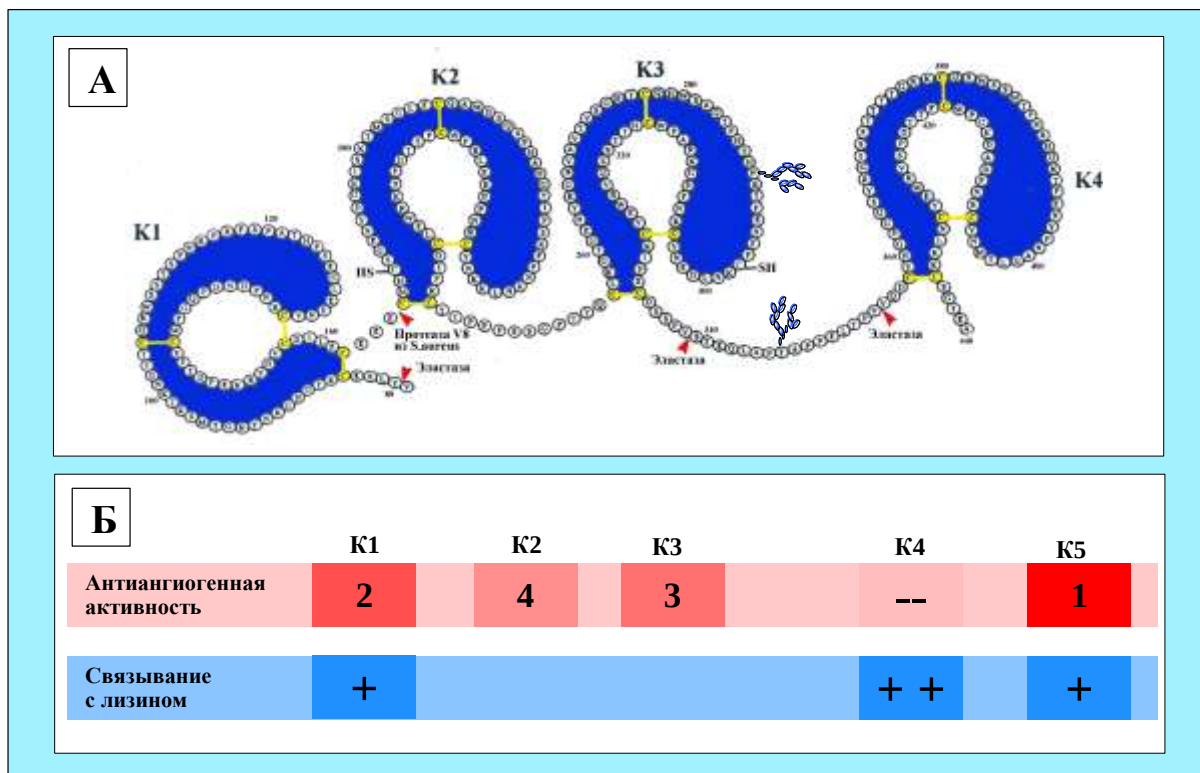


Рис. 19. Структура ангиостатина, включающего крингл-домены K1–4 [Soff 2000] (А) и свойства отдельных крингл-доменов (Б). А. Ангиостатин впервые описан М. О’Рейли в 1994 г. (лаборатория И. Фолкмана) в виде формы K1-4, которая представляет собой протеолитический фрагмент плазминогена. В результате расщепления плазминогена (90 кДа) эластазой образуются формы K1-4 (~41 кДа), K1-3 (~32 кДа), K4, K5. Каждый крингл-домен имеет мол. массу ~9,6 кДа, состоит из ~80 аминокислотных остатков и стабилизирован тремя дисульфидными связями (на рисунке показаны желтым). Показаны также возможные сайты гликозилирования и протеолитического расщепления ангиостатина. Гомология между крингл-доменами K1, K2, K3, K4 составляет около 50%. Б. Крингл-домены, обладающие наиболее высокой антиангиогенной активностью, обозначены интенсивным красным цветом. Форма K1-3 проявляет более высокую антиангиогенную активность, чем K1-4.

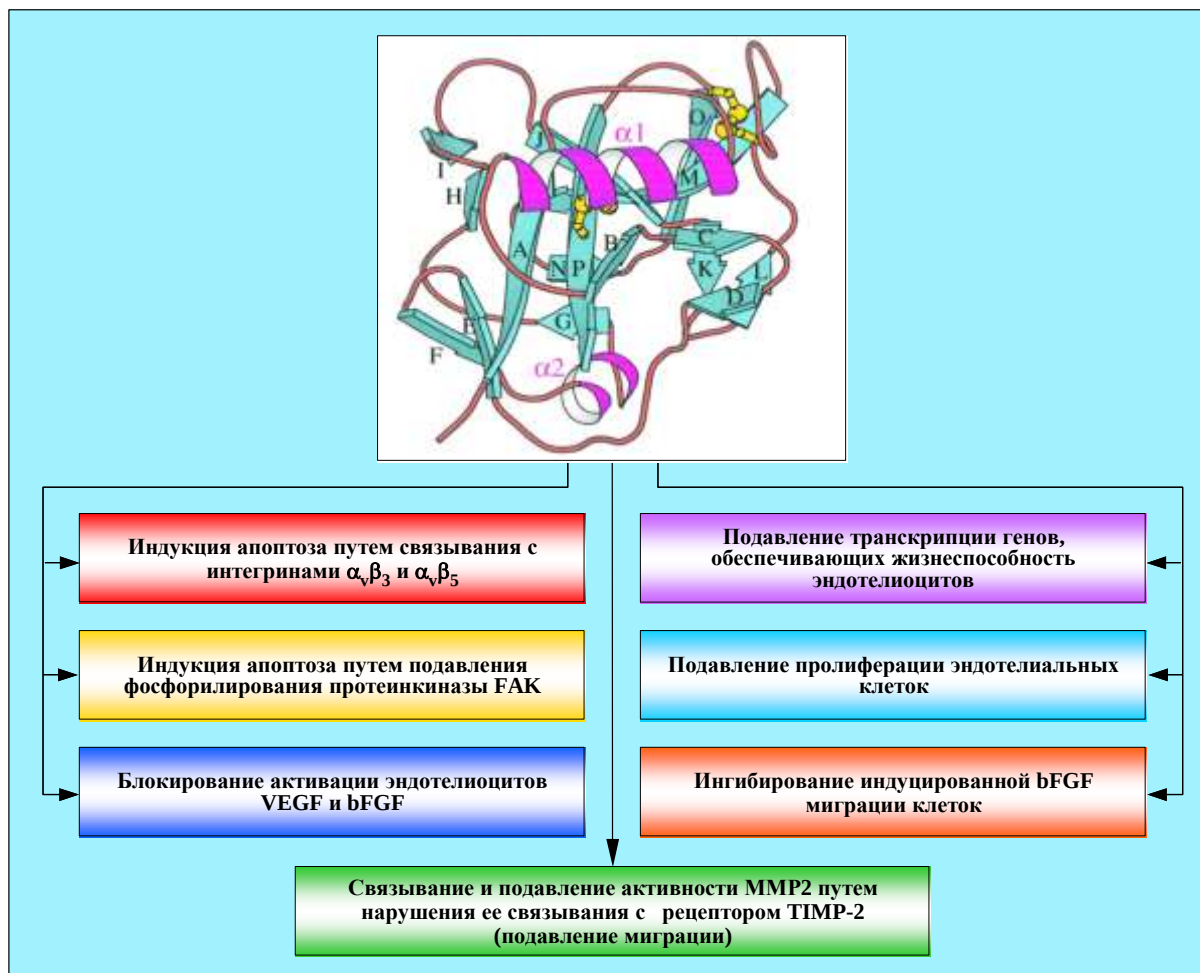


Рис. 20. Структура и некоторые механизмы антиангиогенного действия эндостатина. Эндостатин впервые выделен М. О'Рейли в 1997 г. Эндостатин является протеолитическим фрагментом коллагена XVIII, имеет мол. массу ~22 кДа и состоит из 184 аминокислотных остатков. Молекула эндостатина представляет собой одиночный глобулярный домен, стабилизированный двумя дисульфидными связями. Структура эндостатина предпочтительно представлена β -складчатыми слоями и петлями, но также содержит две α -спирали, одна из которых более короткая. Наиболее характерной особенностью структуры является наличие сложного переплетения β -складчатых слоев (E, F, A, P, J, M и O). Дисульфидные связи образованы остатками Цис 164 и 304, а также Цис 266 и 296. Несмотря на ярко выраженное антиангиогенное действие эндостатина, его детальные механизмы до конца не разьяснены.

Особенности опухолевого метаболизма

Патологическое развитие системы кровоснабжения опухоли приводит к тому, что крупные участки опухолевой ткани оказываются слабо васкуляризированными, а следовательно сталкиваются с постоянным недостатком кислорода, что заставляет опухолевые клетки получать энергию путем гликолиза, результатом которого является накопление в цитозоле кислых побочных продуктов. При этих условиях клетки опухоли для поддержания физиологического уровня pH вынуждены активно экспортировать протоны,

что в свою очередь ведет к закислению внеклеточной среды. Это свойство опухолей можно использовать для подавления их роста путем блокирования активного транспорта протонов и закисления цитозоля опухолевых клеток. Подтверждением действенности такого подхода могут служить обнадеживающие результаты доклинических исследований препаратов, ингибирующих активность мембранного Na^+/H^+ -насоса [329].

Известно, что популяция опухолевых клеток отличается неоднородностью в отношении способности к выживанию при гипоксии. Важными факторами обеспечения выживания опухолевых клеток в условиях гипоксии являются снижение потребления энергии и интенсивности метаболизма, поэтому в центре крупных опухолей обычно наряду с некротической тканью присутствует популяция клеток, пребывающая в состоянии пониженной метаболической активности. Опухолевые клетки способны также посредством повышения уровня экспрессии антиапоптотического белка bcl-2 подавлять апоптотические сигналы, возникающие в ответ на истощение запаса АТФ, происходящее в результате гипоксии. Следует учитывать, что в условиях гипоксии активность многих противоопухолевых препаратов может быть значительно снижена.

Таким образом, опухоли отличаются от нормальных тканей рядом физиологических особенностей, которые делают их уязвимыми и позволяют разрабатывать все новые и новые препараты и стратегии борьбы с онкологическими заболеваниями. На нанопрепараты направленного действия исследователи и клиницисты возлагают особые надежды. Для обеспечения высокой эффективности действия препаратов особенно важным является правильный выбор компонентов и методов присоединения векторных молекул к цитотоксическим агентам или системам их транспорта (наночастицам, липосомам и др.). Проблемы, возникающие при получении препаратов направленного действия, часто связаны с низким выходом продукта, частичной или полной утратой активности токсического агента или векторного белка при конъюгировании, снижением эффективности интернализации в результате неадекватного увеличения молекулярной массы препаратов, увеличением иммуногенности и т.п. В связи с этим для получения активного конъюгата требуется предварительная разработка эффективной стратегии его синтеза и, как правило, неизбежен большой объем экспериментальных работ.

Как уже отмечалось, для получения препаратов направленного действия в качестве векторных молекул широко используются антитела, различные белки и пептиды, которые представляют собой полимеры аминокислот, включающие большое количество реакционноспособных аминокислотных радикалов. Кроме того, специфические реакционноспособные группы могут быть введены в полипептидную цепь путем химической модификации. К наиболее часто используемым для присоединения сшивающих агентов группам белков относятся: аминогруппы (α -аминогруппы аминокислот, ϵ -аминогруппа лизина) [70], тиольные, или сульфгидрильные группы (цистеин, цистин) [163], а также гидроксильные (тирозин) [353] и карбоксильные группы (аспарагиновая и глутаминовая кислоты) [266]. В настоящее время в химии конъюгатов наиболее широкое применение находят amino- и тиольные группы белков.

ХИМИЧЕСКОЕ КОНЬЮГИРОВАНИЕ – КЛЮЧЕВОЙ ИНСТРУМЕНТ НАНОТЕХНОЛОГИЙ

Реагенты для получения конъюгатов

В настоящее время существует широкий спектр реагентов, позволяющих получать препараты направленного действия путем конъюгирования векторных компонентов с различными химиопрепаратами, хромогенными и флуоресцентными красителями, олигонуклеотидами, углеводами, липидами, пептидами и белками, синтетическими полимерами и т.п. Химическое конъюгирование позволяет формировать из двух или нескольких молекул комплексы, которые не только сочетают в себе свойства исходных компонентов, но и отличаются уникальными свойствами.

Реагенты для получения конъюгатов можно подразделить на кросс-линкеры «нулевой длины», гомо- и гетеробифункциональные кросс-линкеры, трифункциональные кросс-линкеры, реагенты для введения в состав вещества флуоресцентных и иных меток и др.

Кросс-линкеры «нулевой длины»

Кросс-линкеры «нулевой длины» обеспечивают образование ковалентной связи между двумя молекулами за счет атомов самих этих молекул, т.е. никакие атомы или их группировки из состава кросс-линкера в конъюгат не привносятся. Поскольку такие конъюгаты не несут связывающих компоненты линкеров, при их внутривенном введении не развиваются иммунные реакции на линкер, что является бесспорным преимуществом кросс-линкеров «нулевой длины» перед другими реагентами.

К группе кросс-линкеров «нулевой длины» относятся карбодиимиды, опосредующие образование амидных связей между амино- и карбоксильными группами. Одним из наиболее широко применяемых для получения конъюгатов карбодиимидов является реагент EDC, или EDAC – (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид (рис. 21). Механизм реакции конъюгирования с участием реагента EDC приведен на рис. 22. С помощью EDC могут быть получены конъюгаты самых разнообразных молекул, одна из которых является первичным амином, а другая – карбоновой кислотой. Реагент EDC растворим в воде, и его избыток может быть легко удален после проведения реакции с помощью диализа или гель-фильтрации. Структуры некоторых других кросс-линкеров «нулевой длины» приведены на рис. 23.

Конъюгаты двух соединений могут быть также получены при непосредственном взаимодействии первичных и вторичных аминов с альдегидами и кетонами. В процессе конъюгирования последовательно образуются неустойчивые карбиноламины, замещенные имины и, наконец, при восстановлении последних

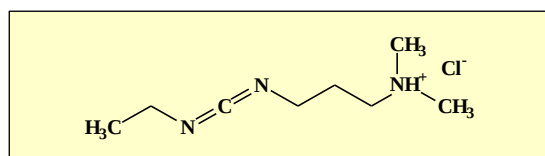


Рис. 21. Химическая структура кросс-линкера «нулевой длины» – EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид). Мол. масса кросс-линкера составляет 191,7.

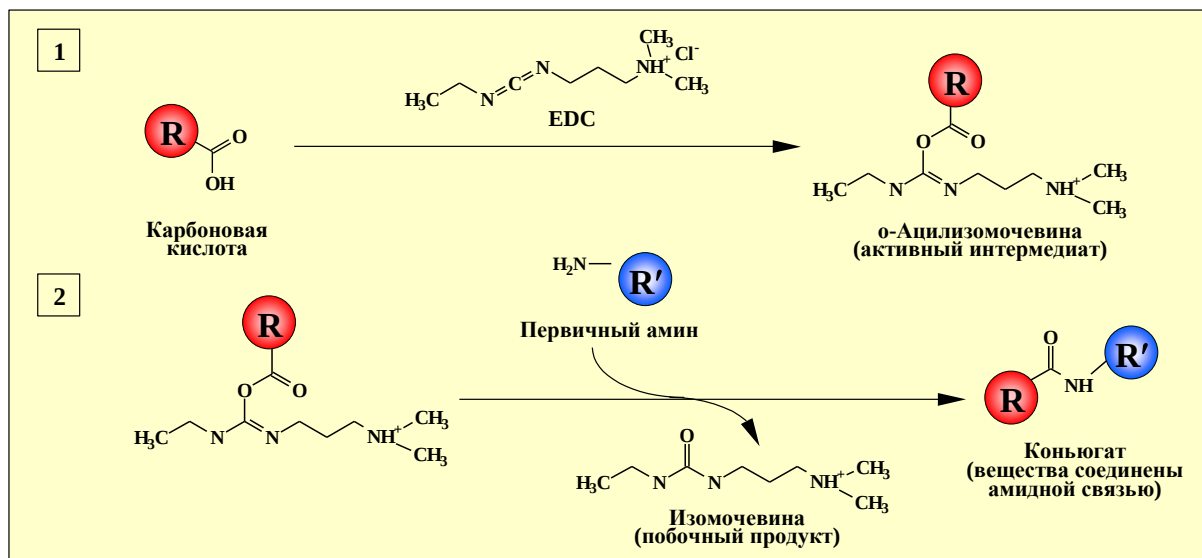


Рис. 22. Схема реакции конъюгирования карбоновых кислот (R) и первичных аминов (R'), осуществляемой с помощью кросс-линкера EDC.

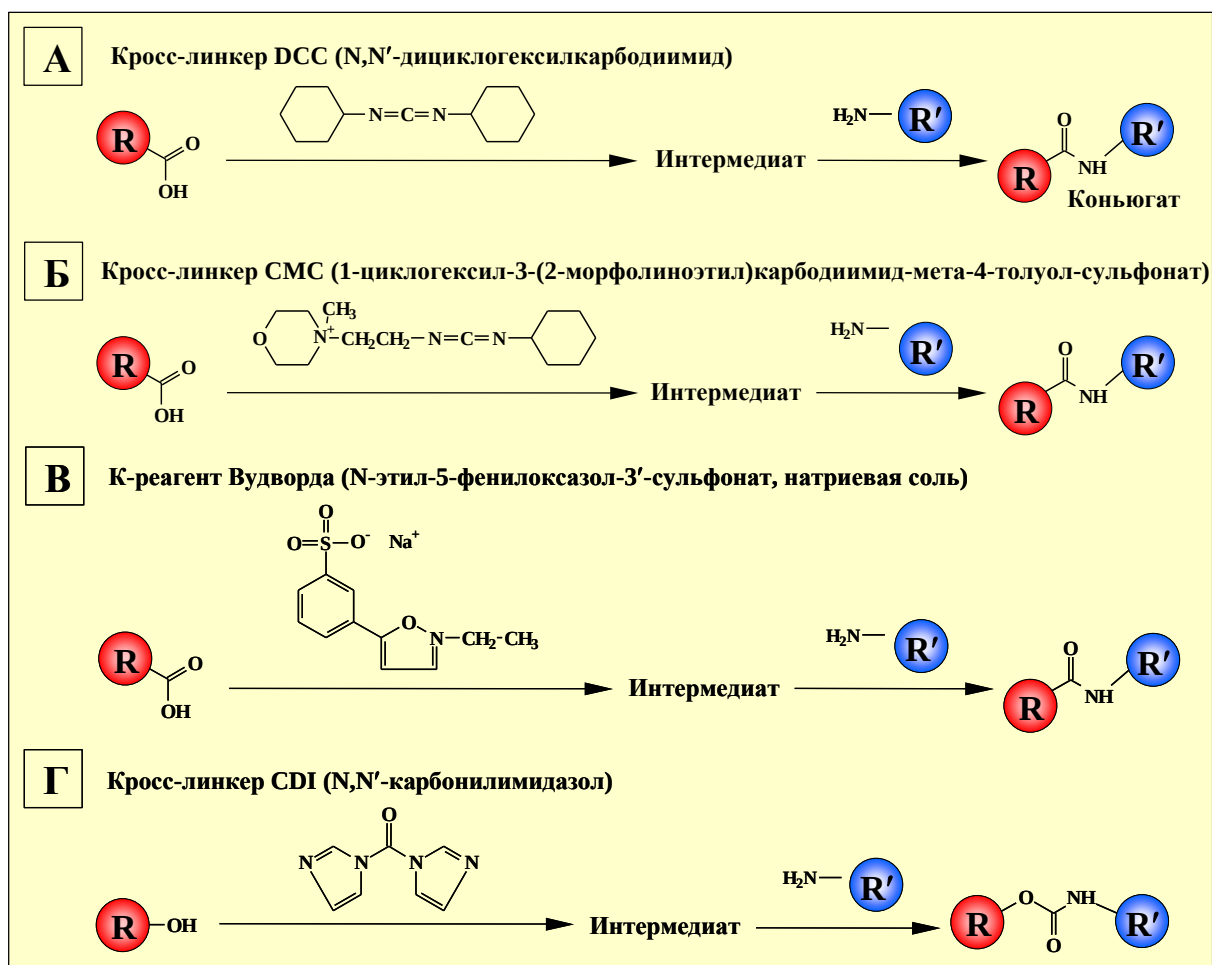


Рис. 23. Некоторые представители кросс-линкеров «нулевой длины», применяемых для получения конъюгатов.

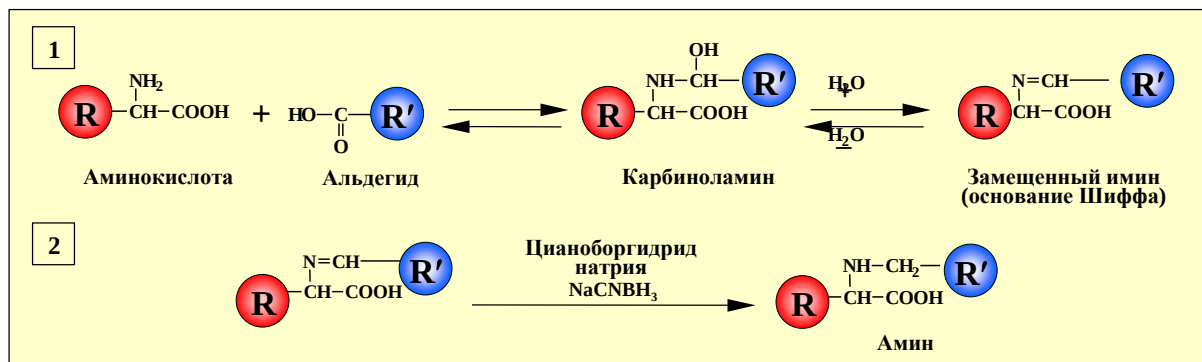


Рис. 24. Схема реакции получения конъюгатов соединений, содержащих amino- и альдегидные группы. При взаимодействии первичных аминов с альдегидами образуются замещенные имины (основания Шиффа) через стадию образования карбиноламинов. Основание Шиффа – довольно лабильная связь, которая легко гидролизуется с образованием исходных продуктов. Конъюгат стабилизируется при восстановлении оснований Шиффа, например, цианоборгидридом натрия.

– устойчивые амины (рис. 24). При таком способе конъюгирования, также как и при применении карбодиимидов, в полученный конъюгат не привносится никаких посторонних атомов или их группировок.

Гомобифункциональные кросс-линкеры

Большинство кросс-линкеров этого класса представляет собой цепочки углеродных атомов различной длины, на обоих концах которых находятся идентичные реакционноспособные группы. Гомобифункциональные кросс-линкеры (гомо-БКЛ) способны связать, например, две белковые молекулы или белковую молекулу с химиопрепаратом. При этом гомо-БКЛ взаимодействует с одними и теми же группами, присутствующими в составе разных молекул, участвующих в конъюгировании. В зависимости от длины углеродной цепочки линкера молекулы в составе конъюгата могут быть пространственно сближены или удалены друг от друга. Существенным недостатком гомо-БКЛ является низкий выход целевого продукта при проведении реакции конъюгирования. Это связано с образованием неактивных конъюгатов различного состава (рис. 25). Несмотря на очевидные недостатки, гомо-БКЛ находят применение в лабораторной практике при получении конъюгатов. Из наиболее известных гомо-БКЛ следует отметить кросс-линкеры, включающие N-гидроксисукцинимидные эфиры, к которым относятся реагент DSC (N,N'-дисукцинимидилкарбонат, рис. 26), реагент DSG (дисукцинимидилглутарат, рис. 27), реагент DST (дисукцинимидилтарtrat, рис. 28), реагент DSP (дитиобис(сукцинимидилпропионат), рис. 29). Все перечисленные кросс-линкеры отличаются высокой реакционной способностью в диапазоне физиологических значений pH и могут быть использованы для получения конъюгатов соединений, имеющих как

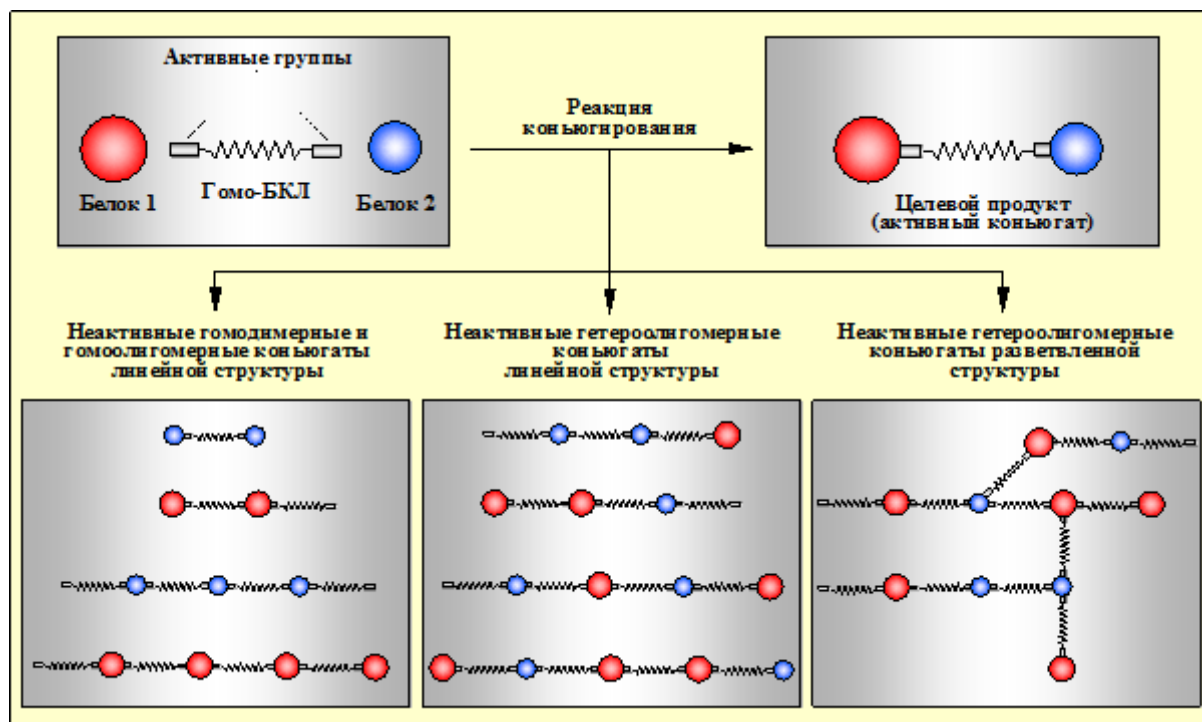


Рис. 25. Иллюстрация причин низкого выхода целевого продукта при использовании гомобифункциональных кросс-линкеров (гомо-БКЛ) для получения конъюгатов. В процессе конъюгирования молекулы (например, белки) могут образовывать неактивные гомодимеры, гомоолигомеры и различные гетероолигомеры. Образование неактивных конъюгатов не только резко снижает выход целевого продукта, но и затрудняет его последующую очистку.

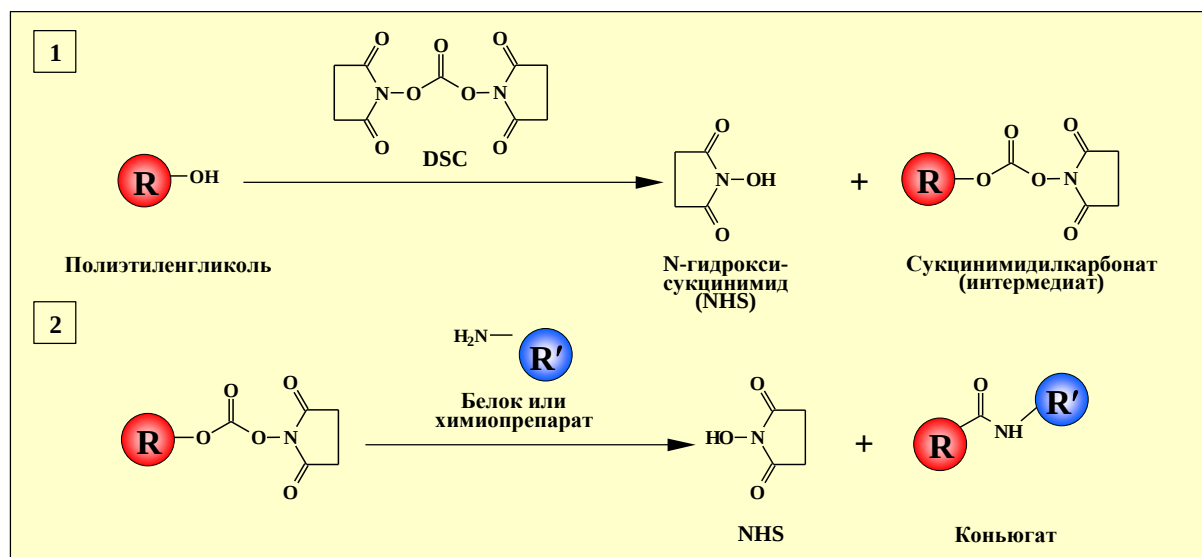


Рис. 26. Схема реакции получения конъюгатов с помощью гомобифункционального кросс-линкера DSC (N,N'-дисукцинимидилкарбонат). Реагент DSC часто используют для активации полиэтиленгликолей (ПЭГ) и последующего их конъюгирования с белками. Реакцию проводят в апротонных растворителях. Реагент DSC реагирует с гидроксильными группами ПЭГ с образованием сукцинимидилкарбонатного производного, которое вступает в реакцию с аминогруппами белков с образованием конъюгата, компоненты которого связаны ковалентной связью.

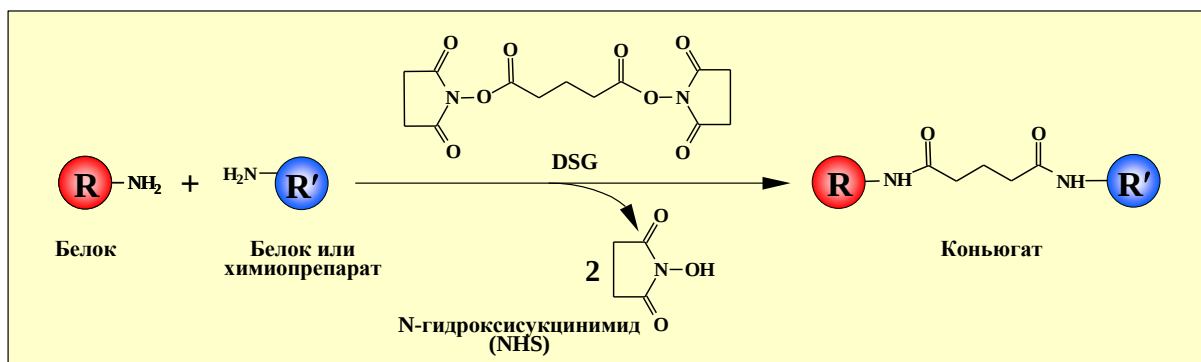


Рис. 27. Схема реакции получения конъюгатов с помощью гомобифункционального кросс-линкера DSG (дисукцинимидилглутарат). Перед добавлением в водную реакцию смесь DSG растворяют в диметилсульфоксиде. Активные группы кросс-линкера реагируют с аминогруппами конъюгируемых молекул с образованием конъюгата, стабилизированного амидными связями.

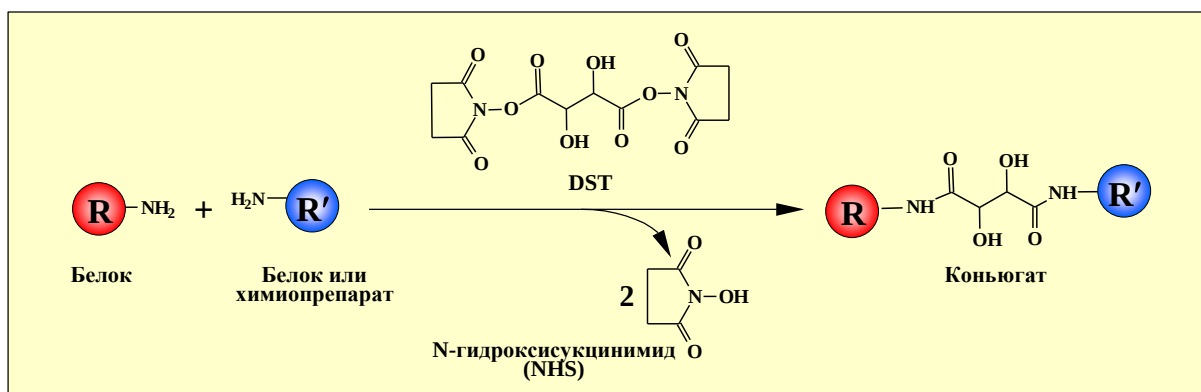


Рис. 28. Схема реакции получения конъюгатов с помощью гомобифункционального кросс-линкера DST (дисукцинимидилтарtrate). Кросс-лиinker DST образует амидные связи с α- и ε-аминогруппами белков или других молекул. Перед добавлением в реакцию смесь кросс-линкера растворяют в диметилсульфоксиде.

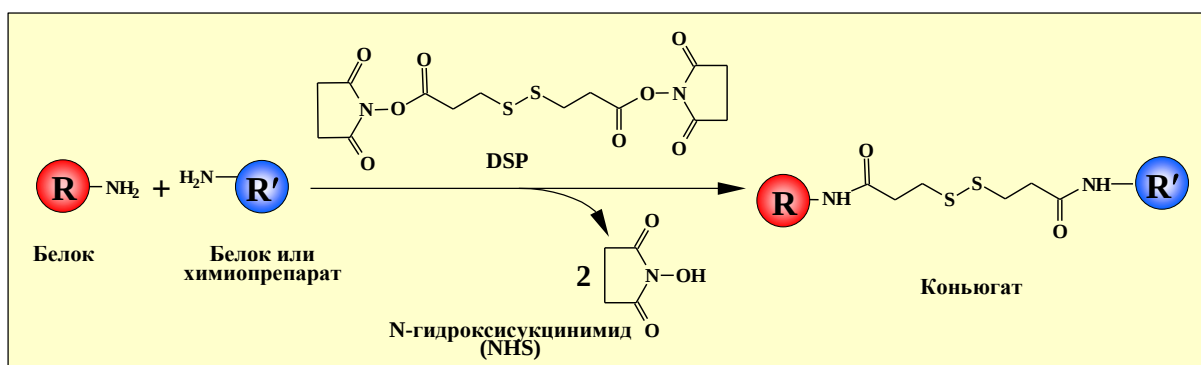


Рис. 29. Схема реакции получения конъюгатов с помощью гомобифункционального кросс-линкера DSP (дитиобис(сукцинимидилпропионат)). Перед добавлением в реакцию смесь кросс-линкера растворяют в диметилсульфоксиде или диметилформамиде. Молекулы в конъюгате связаны амидными связями через линкер, состоящий из 8 атомов. Благодаря присутствию в структуре линкера дисульфидной связи конъюгат может быть легко расщеплен с помощью дитиотреитола или другого подходящего реагента.

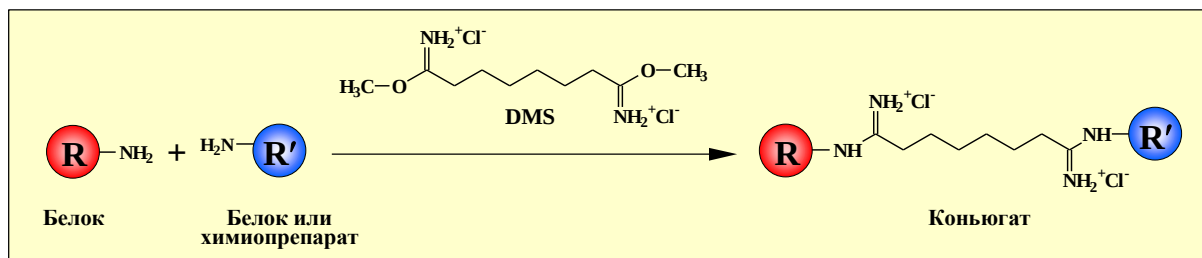


Рис. 30. Схема реакции получения конъюгатов с помощью гомобифункционального водорастворимого кросс-линкера DMS (диметилсуберимидат). Кросс-линкер содержит на обоих концах молекулы имидоэфирные группировки, реагирующие с аминогруппами соединений, участвующих в конъюгировании. В результате получается конъюгат, компоненты которого связаны с нерасщепляемым углеводородным линкером амидиновой связью. При физиологических значениях pH конъюгат несет два дополнительных положительных заряда, приносимых кросс-линкером.

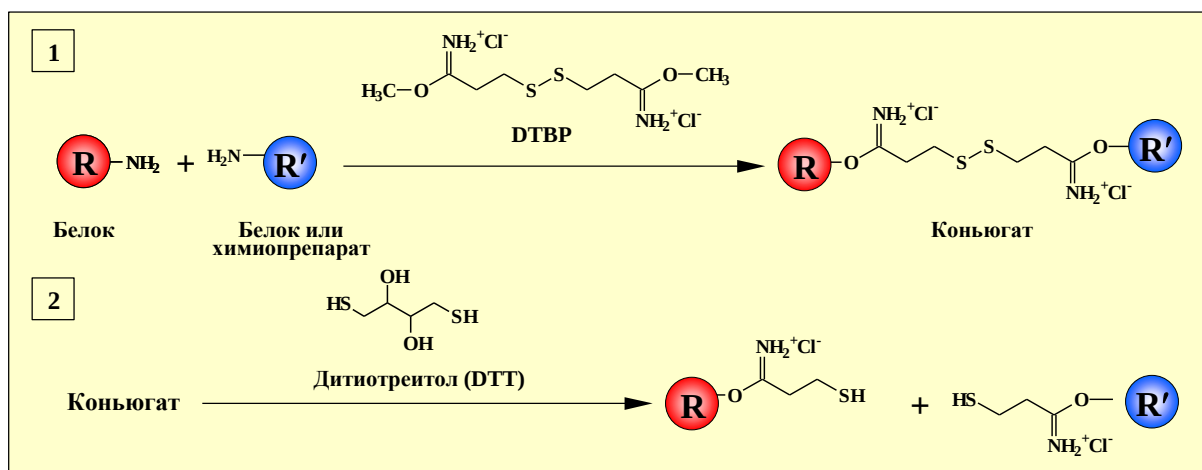


Рис. 31. Схема реакции получения конъюгатов с помощью гомобифункционального водорастворимого кросс-линкера DTBP (диметил-3,3'-дитиобиспропиониимидат). В отличие от конъюгатов, полученных с помощью кросс-линкера DMS, данные конъюгаты могут быть расщеплены путем восстановления дисульфидной связи.

аминогруппы (DSG, DST, DSP), так и гидроксильные группы (DSC).

К гомо-БКЛ относятся также реагенты, содержащие на обоих концах молекулы имидоэфирные группировки. Наиболее известными кросс-линкерами этого типа являются DMS (диметилсуберимидат, рис. 30) и DTPB (диметил-3,3'-дитиобиспропиониимидат, рис. 31). Оба кросс-линкера могут применяться для получения конъюгатов веществ, содержащих аминогруппы. При этом конъюгаты, полученные с помощью кросс-линкера DMS, содержат компоненты, соединенные нерасщепляемым углеводородным мостиком. Конъюгаты, полученные с помощью DTPB, могут быть легко расщеплены дитиотреитолом, поскольку линкер, соединяющий компоненты конъюгата, содержит дисульфидную связь.

Важной группой гомо-БКЛ являются реагенты, обеспечивающие возможность конъюгирования соединений, содержащих свободные тиольные группы. Белки или другие молекулы, не содержащие свободных тиольных групп, но содержащие в своей структуре

дисульфидные связи, перед конъюгированием подвергают действию меркаптоэтанола для частичного или полного восстановления этих связей. Одним из наиболее известных представителей гомо-БКЛ, взаимодействующих с тиольными группами, является DPDPB (1,4-ди-[3'-(2'-пиридилдитио)пропионамидо]бутан), содержащий на обоих концах молекулы дитиопиридилные группировки, способные реагировать с тиольными группами белков или других соединений с образованием дисульфидных связей. Полученные конъюгаты могут

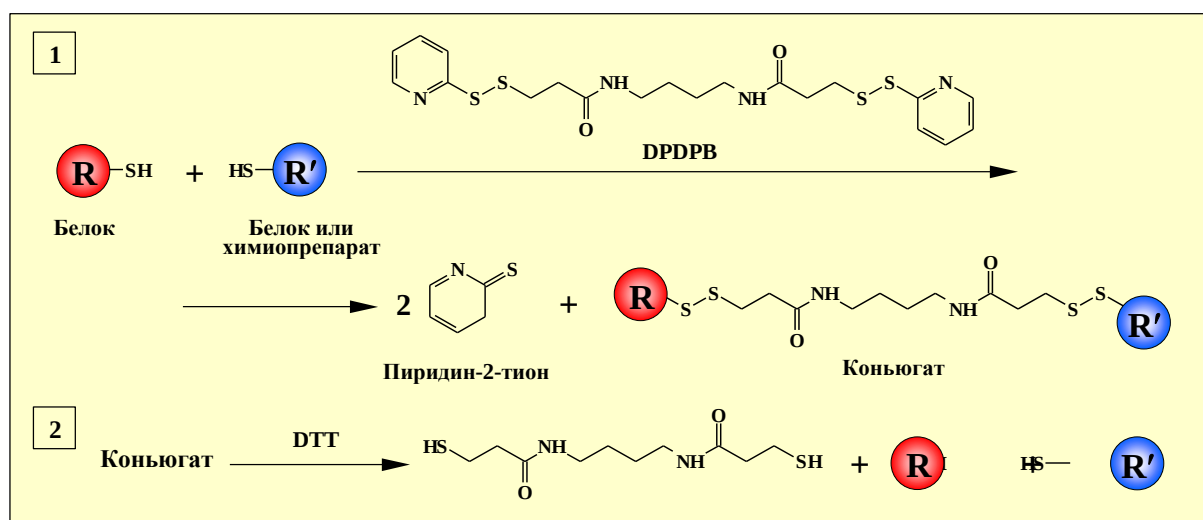


Рис. 32. Схема реакции получения конъюгатов с помощью гомобифункционального кросс-линкера DPDPB (1,4-ди-[3'-(2'-пиридилдитио)-пропионамидо]бутан). Дитиопиридилные группировки реагируют с тиольными группами белков или других соединений с образованием дисульфидных связей и освобождением пиридин-2-тиона. Конъюгат может быть расщеплен путем восстановления дисульфидных связей дитиотреитолом. Кросс-линкер DPDPB плохо растворим в воде и требует растворения в диметилсульфоксиде перед внесением в реакционную смесь.

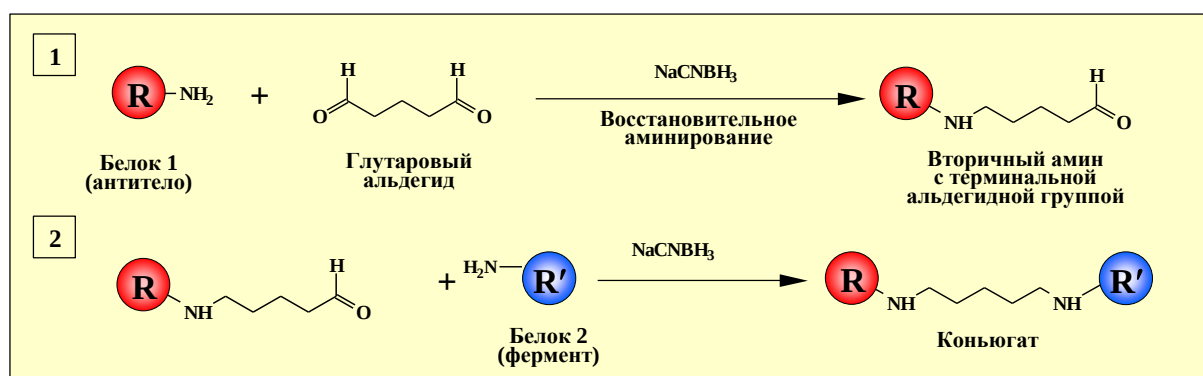


Рис. 33. Схема двухстадийного получения конъюгата белков с помощью гомобифункционального кросс-линкера глутарового альдегида. 1. В результате реакции глутарового альдегида с белком образуются основания Шиффа, восстановление которых приводит к образованию стабильного производного белка с реакционноспособной альдегидной группой. 2. После хроматографической очистки в препарат, содержащий производное, вносят второй белок. В результате описанных реакций образуется стабильный конъюгат двух белков.

быть легко расщеплены с помощью восстанавливающих агентов, подобных меркаптоэтанолу или дитиотреитолу (рис. 32).

Еще одной важной группой кросс-линкеров являются гомобифункциональные альдегиды, среди которых наиболее часто для получения конъюгатов белков с белками, пептидами или другими соединениями используется глутаровый альдегид. Ранее глутаровый альдегид широко применяли для получения конъюгатов антител с различными ферментами. Для того чтобы избежать формирования высокомолекулярных комплексов, включающих множество молекул антител и фермента, «перешитых» между собой глутаровым альдегидом, процедуру конъюгирования обычно проводили в два этапа. На первом этапе антитела модифицировали глутаровым альдегидом и очищали. Затем к препарату прибавляли

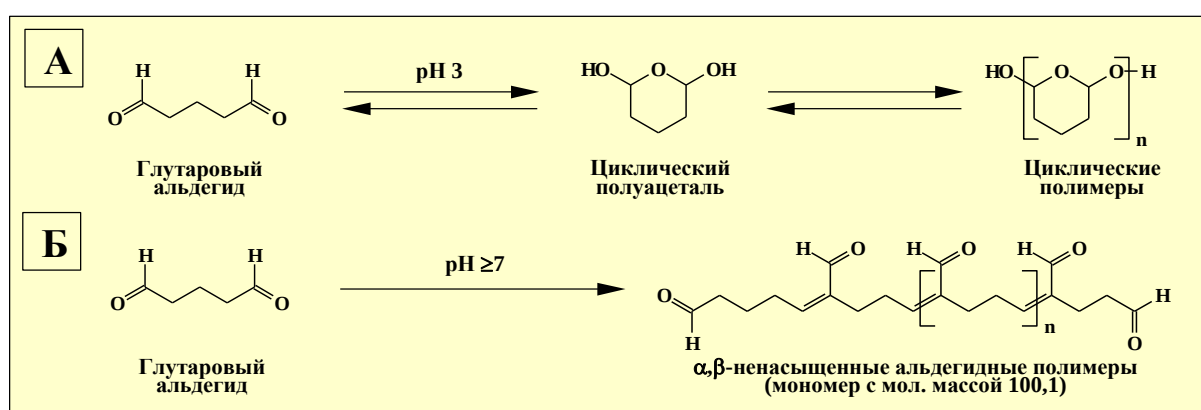


Рис. 34. Полимеризация глутарового альдегида. А. В кислотной среде глутаровый альдегид образует циклические полимеры различной длины. Б. В нейтральной или щелочной среде глутаровый альдегид образует ненасыщенные альдегидные полимеры, длину которых из-за вариабельности невозможно прогнозировать.

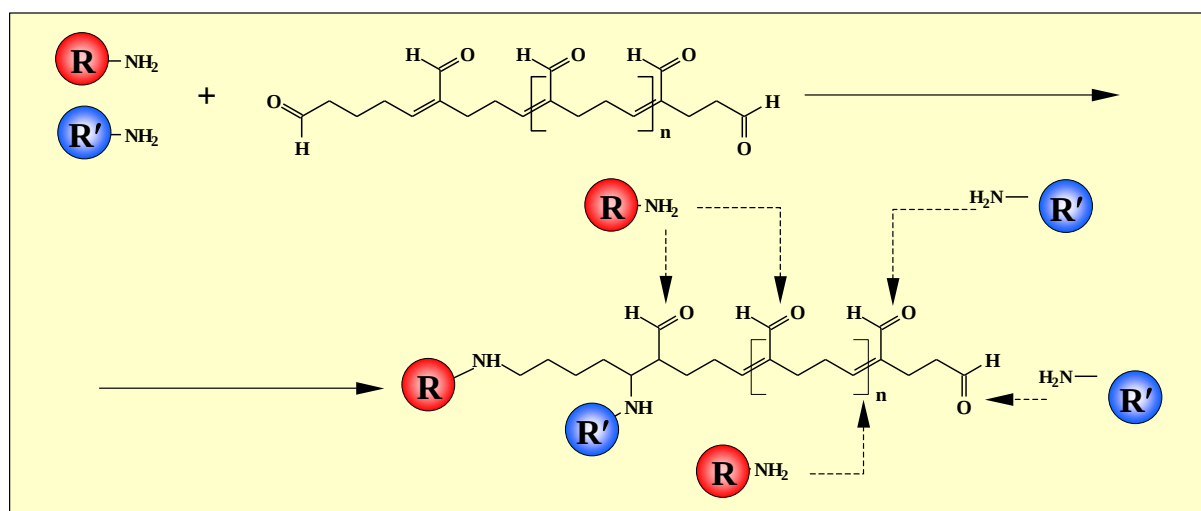


Рис. 35. Взаимодействие белков с ненасыщенными альдегидными полимерами глутарового альдегида. Из-за большого количества реакционноспособных групп и наличия полимеров различной длины могут образовываться конъюгаты полимеров с белками непредсказуемого состава.

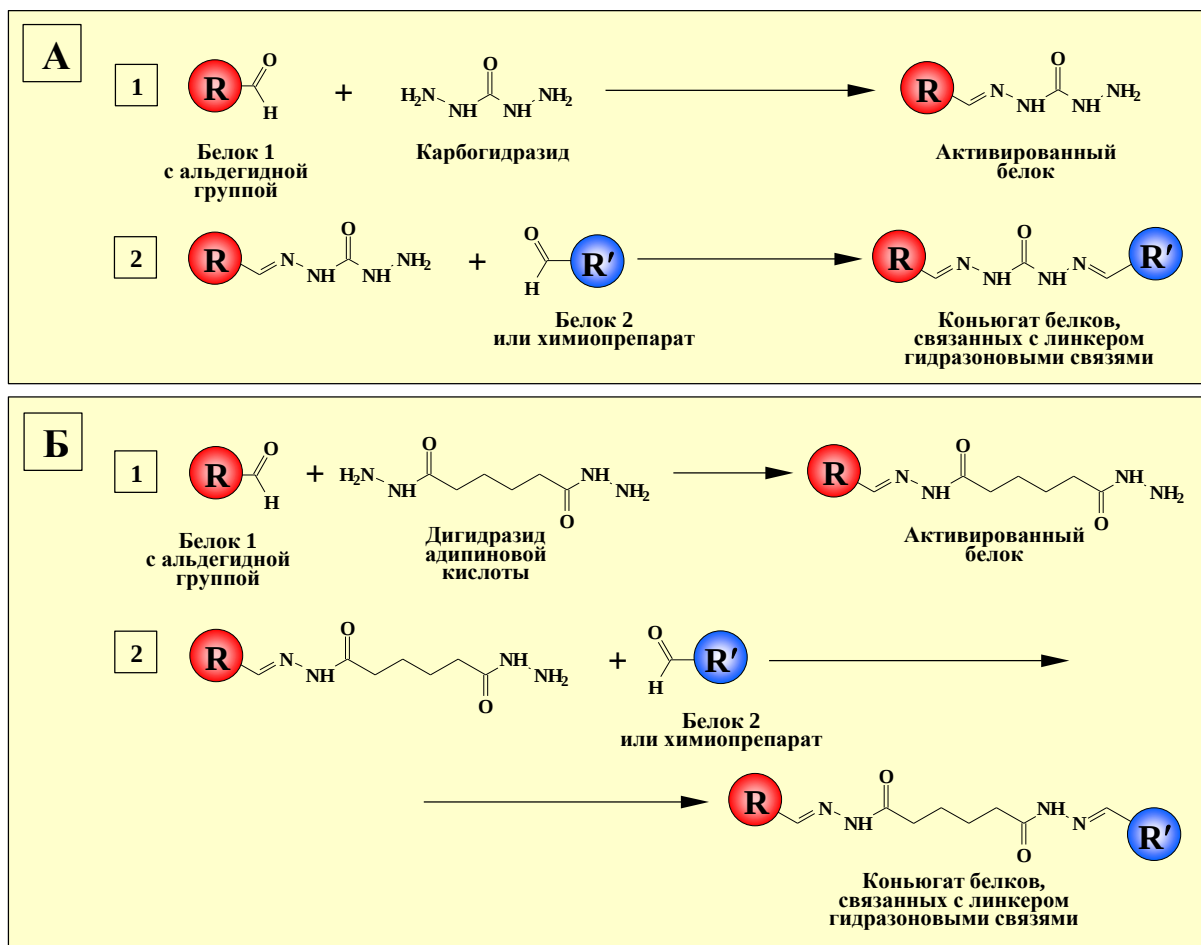


Рис. 36. Схема реакций получения конъюгатов белков или других соединений, содержащих альдегидные группы, с помощью гомобифункциональных кросс-линкеров карбогидразида (А) и дигидразида адипиновой кислоты (Б). Белки образуют с этими кросс-линкерами промежуточные продукты, в которых белок связан гидразоновой связью с линкером, несущим концевую гидразидную группировку (1). Эти промежуточные соединения могут образовывать конъюгаты с другими соединениями, имеющими альдегидные группы (2).

фермент, и в результате его взаимодействия с модифицированными антителами получали конъюгат.

Реакция глутарового альдегида с аминогруппами белков и других соединений проходит через стадию образования оснований Шиффа, последующее восстановление которых с помощью цианоборгидрида натрия или других подходящих восстановителей приводит к образованию стабильных конъюгатов. На рис. 33 представлена идеализированная схема получения конъюгата, поскольку в действительности в процессе конъюгирования глутаровый альдегид может образовывать полимерные цепочки различной длины, а полученные на первой стадии (рис. 33, 1) производные благодаря наличию свободных альдегидных групп могут образовывать неактивные гомодимерные комплексы. Помимо линейных полимеров в водных растворах глутаровый альдегид может образовывать циклические и разветвленные ненасыщенные полимеры (рис. 34). Благодаря наличию

множества альдегидных групп разветвленные полимеры различной молекулярной массы могут вступать в реакцию с белками, образуя производные и конъюгаты непредсказуемого строения и состава (рис. 35). Таким образом, главным недостатком глutarового альдегида при его использовании в качестве кросс-линкера является сложность получения воспроизводимых результатов и достижения высоких выходов целевых продуктов. Тем не менее, гомогенный конъюгат может быть получен после оптимизации условий конъюгирования и соответствующей хроматографической очистки.

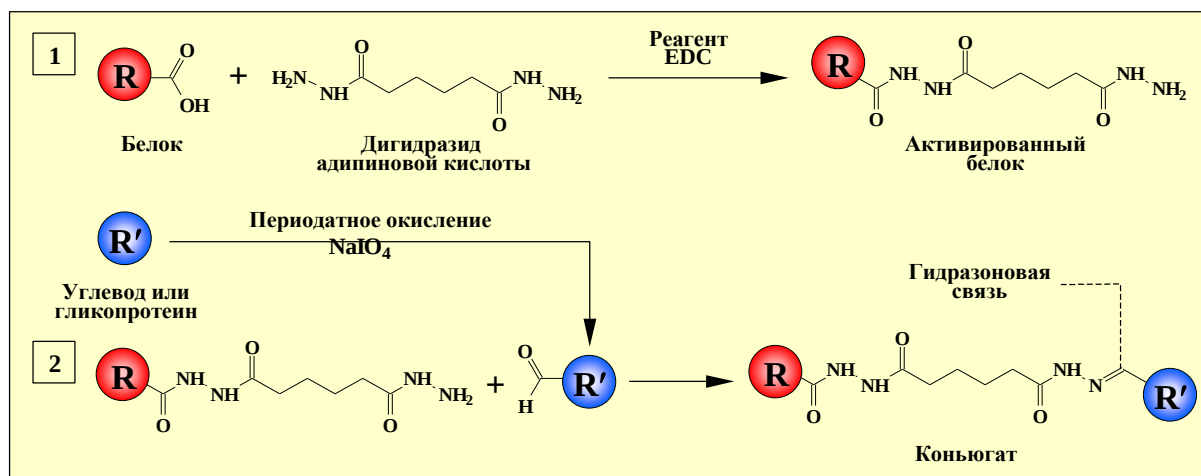


Рис. 37. Схема двустадийного получения конъюгатов белков с углеводами или гликопротеинами с помощью гомобифункционального кросс-линкера – дигидразида адипиновой кислоты. На первой стадии гидразидная группа кросс-линкера реагирует с карбоксильной группой белка в присутствии реагента EDC. В полученном активированном интермедиате кросс-линкер связан с белком имидной связью и имеет свободную терминальную гидразидную группу. На второй стадии гидразидная группа активированного белка реагирует с альдегидной группой углевода (или гликопротеина), предварительно окисленного периодатом натрия. Для стабилизации конъюгата гидразоновые связи могут быть восстановлены цианоборгидридом натрия с образованием вторичной аминной связи.

К гомо-БКЛ относятся также реагенты, имеющие на обоих концах гидразидные группировки, способные взаимодействовать с карбонильными и карбоксильными группами. Наиболее известными гомобифункциональными гидразидами, применяемыми для получения белковых конъюгатов, являются карбогидразид, или 1,3-диаминомочевина, и дигидразид адипиновой кислоты. При использовании карбогидразида конъюгируемые молекулы связываются между собой посредством короткого пятиатомного линкера, при использовании дигидразида адипиновой кислоты – посредством десятиатомного. Существенным преимуществом карбогидразида перед дигидразидом адипиновой кислоты является его высокая растворимость в воде. Оба гомобифункциональных гидразида могут быть использованы для получения конъюгатов белков или других соединений, имеющих альдегидные группы (рис. 36).

Гомобифункциональные гидразиды могут также взаимодействовать с карбоксильными группами белков в присутствии кросс-линкера «нулевой длины» EDC.

Модифицированные таким образом белки могут образовывать конъюгаты с другими соединениями, имеющими альдегидные группы, или углеводами и гликопротеинами, предварительно окисленными периодатом натрия (рис. 37).

Таким образом, существует довольно большой выбор гомо-БКЛ, позволяющих получать конъюгаты белков с самыми разнообразными химическими соединениями. Несмотря на ряд недостатков, гомо-БКЛ достаточно широко применяются и в настоящее время.

Гетеробифункциональные кросс-линкеры

Гетеробифункциональные кросс-линкеры (гетеро-БКЛ) отличаются от гомобифункциональных наличием на концах молекулы не одинаковых, а разных активных группировок, позволяющих осуществлять конъюгирование белков или других соединений, также содержащих разные активные группы.

Чаще всего при применении гетеро-БКЛ сначала подвергают модификации белок с получением активного интермедиата, который очищают хроматографическими методами. Затем к интермедиату добавляют второе соединение, взаимодействие которого со свободной активной группировкой кросс-линкера приводит к образованию конъюгата, который также подвергают хроматографической очистке. Схема двустадийного получения конъюгата, представленная на рис. 38, является оптимальной, и ее реализация возможна при условии, что каждое из вступающих в реакцию конъюгирования веществ несет лишь по одной реакционноспособной группе. На практике такое встречается не часто, и поэтому наличие даже двух активных групп в составе каждого из вступающих в реакцию соединений может

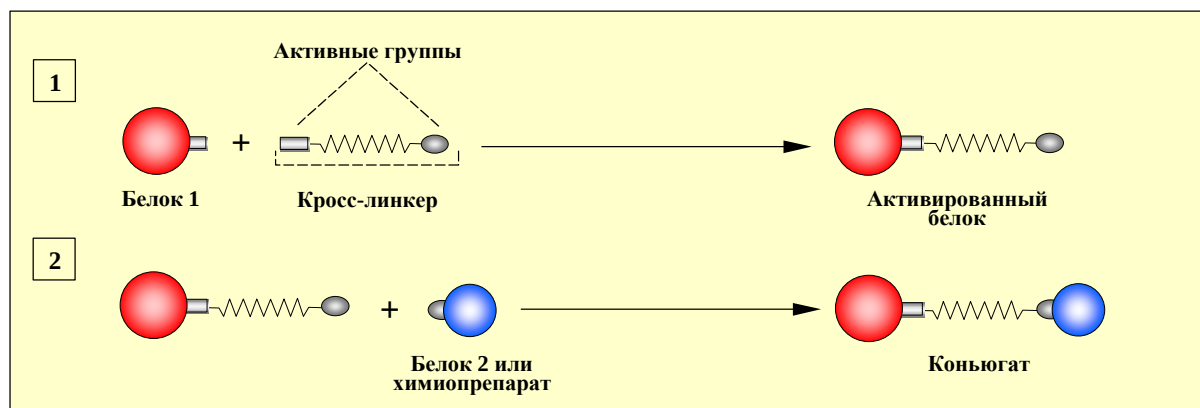


Рис. 38. Общая схема двустадийного получения конъюгатов с помощью гетеробифункциональных кросс-линкеров (гетеро-БКЛ). Гетеро-БКЛ имеют на концах молекулы разные активные группировки, позволяющие осуществлять конъюгирование белков или других соединений, также содержащих разные активные группы. Чаще всего при применении гетеро-БКЛ сначала подвергают модификации белок с получением активного интермедиата, который очищают хроматографическими методами. Затем к интермедиату добавляют второе соединение, взаимодействие которого со свободной активной группировкой кросс-линкера приводит к образованию конъюгата, который также подвергают хроматографической очистке.

приводить к образованию различных высокомолекулярных форм конъюгата и значительному снижению выхода целевого продукта (рис. 39). Обычно путем рационального подбора природы реакционноспособных групп и оптимизации условий проведения реакции конъюгирования экспериментаторы стараются получать конъюгаты предсказуемого состава и структуры.

Применение гетеро-БКЛ позволяет более точно по сравнению с гомо-БКЛ регулировать размеры, соотношение компонентов и конфигурацию структуры конъюгатов за счет более широких возможностей выбора природы реакционноспособных групп, присутствующих в конъюгируемых соединениях, а также двустадийности процесса

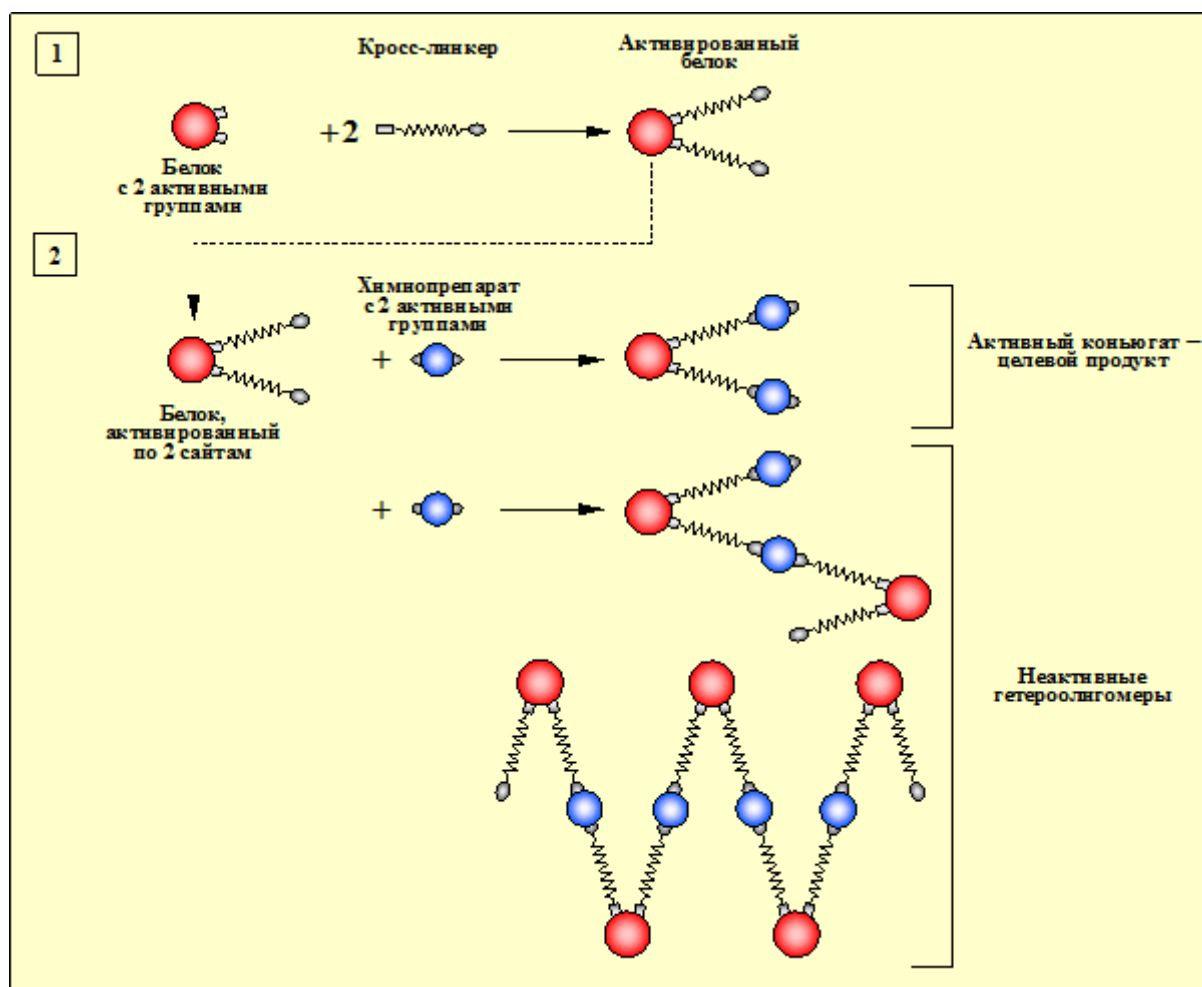


Рис. 39. Схема получения конъюгатов с помощью гетеробифункционального кросс-линкера. Представлены соединения (белок и химический препарат), каждое из которых содержит по две активные группы, способные реагировать с активными группами кросс-линкера. На стадии 1 при избытке кросс-линкера образуется активированный белок с соотношением белок : линкер, равным 1:2. На стадии 2, помимо активных форм конъюгата (целевой продукт), могут образовываться гетероолигомеры с различным составом и соотношением компонентов. Образование гетероолигомеров значительно снижает выход целевого продукта и усложняет его очистку. Для повышения выхода целевого продукта необходим тщательный подбор условий конъюгирования.

конъюгирования, позволяющей избежать «перешивки» молекул и на первой стадии регулировать степень модификации белка (или иного соединения), а на второй – количество присоединяемого биологически активного вещества (рис. 40).

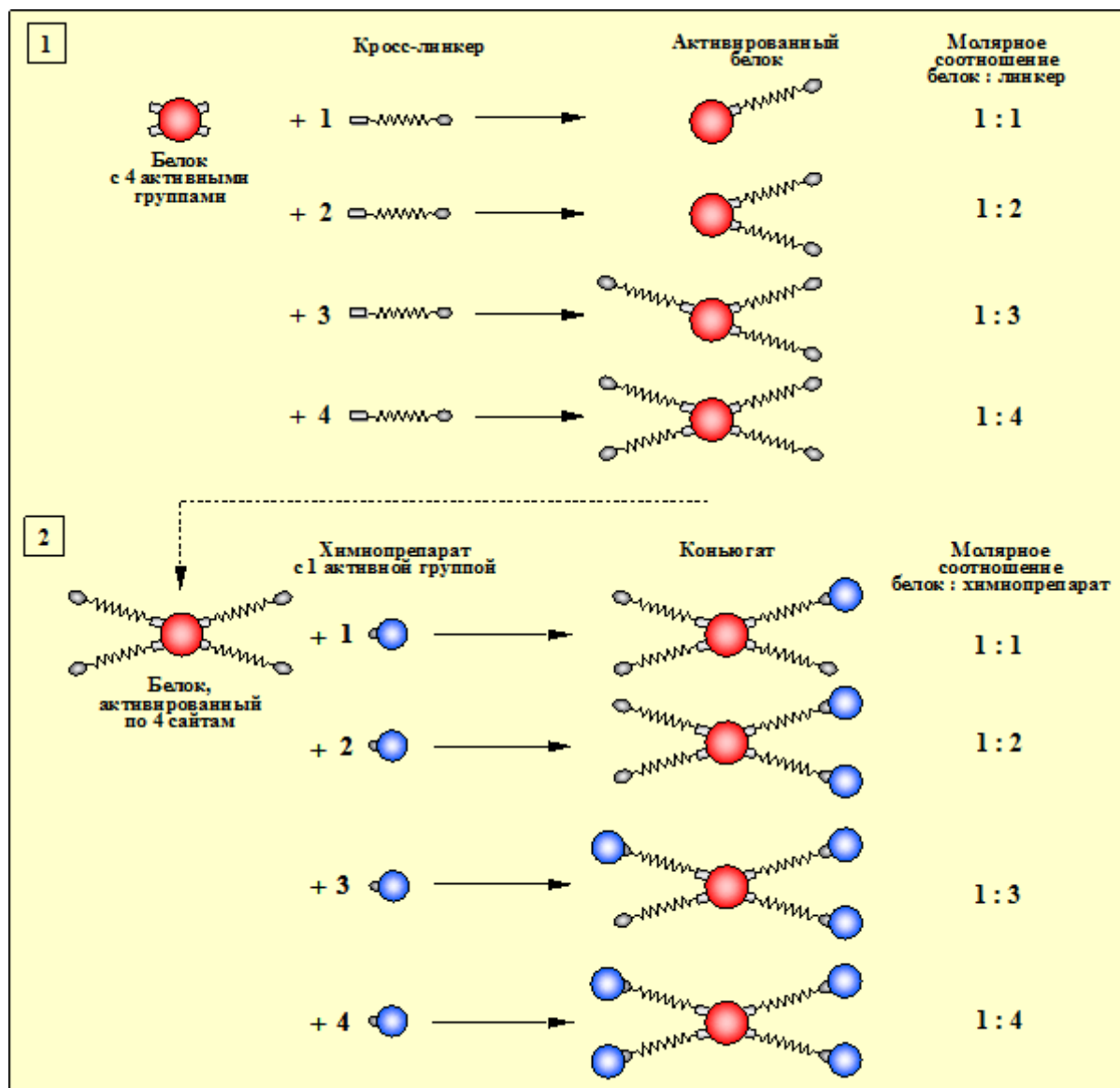


Рис. 40. Схема, иллюстрирующая возможность манипуляции соотношением компонентов в конъюгатах, полученных с помощью гетеробифункционального кросс-линкера. На рисунке представлен белок, содержащий 4 активных группы, способных взаимодействовать с одной из активных групп кросс-линкера. Уже на стадии 1 получения конъюгата можно, манипулируя концентрацией кросс-линкера, получать интермедиаты с различным молярным соотношением белок : линкер (от 1:1 до 1:4). На стадии 2 в реакцию с активированным белком вступает химиопрепарат (в данном случае молекула химиопрепарата содержит только одну активную группу, способную реагировать с кросс-линкером). В зависимости от концентрации химиопрепарата в реакционной смеси можно получать конъюгаты с различным соотношением белок : химиопрепарат (от 1:1 до 1:4). После хроматографической очистки конъюгата с заданным молярным соотношением компонентов непрореагировавшие активные группы линкера могут быть инактивированы соответствующими реагентами.

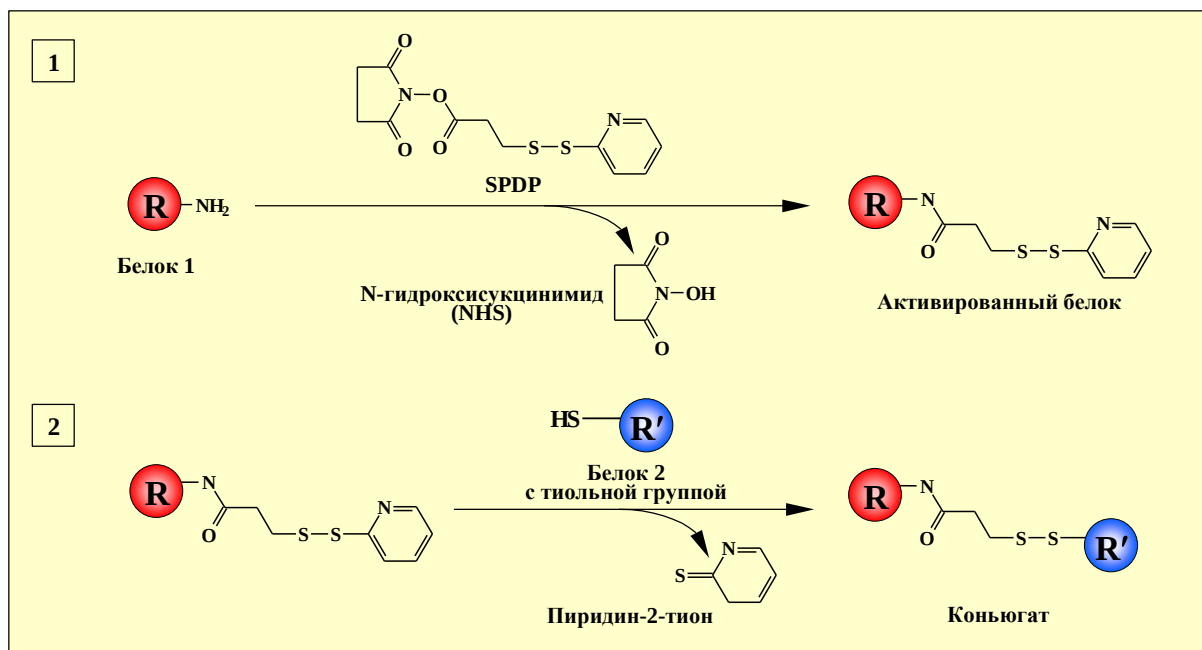


Рис. 41. Схема реакции получения конъюгатов белков, содержащих свободные амино- (R) и тиольные (R') группы, с помощью кросс-линкера SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридиндитио)пропионата).

В настоящее время для получения конъюгатов белков с белками или белков с другими соединениями наиболее широко применяемыми реагентами являются гетеро-БКЛ, активные группировки которых способны вступать в реакцию с амино- и тиольными группами. Не будет преувеличением сказать, что наиболее популярным у исследователей кросс-линкером этой группы является SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионат). Одна из концевых активных группировок молекулы SPDP используется для модификации белков по аминогруппам, вторая – по тиольным. К бесспорным достоинствам кросс-линкера SPDP относится возможность получения с его помощью конъюгатов белков как в случае, когда при конъюгировании используются аминогруппы одного белка и тиольные группы другого (рис. 41), так и в случае, когда используются лишь аминогруппы обоих белков (рис. 42). Кросс-линкер SPDP плохо растворим в воде, и перед добавлением в реакционную смесь его растворяют в диметилсульфоксиде. Аналог SPDP – сульфо-LC-SPDP (LC от англ. *long-chain*) – обладает большей длиной линкерной цепи и является водорастворимым реагентом (рис. 43). Кроме того, кросс-линкер сульфо-LC-SPDP содержит в линкерной цепи амидную связь, которая может легко расщепляться при попадании препарата в лизосомы. Наличие гидролизуемой связи в составе линкера может быть очень важным, например, в случае, когда с помощью данного линкера связаны векторный белок и, например, противоопухолевый антибиотик. Удлиненный кросс-линкер может быть также более удобен в случаях, когда конъюгированию подвергаются крупные белки, тиольные группы которых обычно локализованы не на поверхности, а вблизи гидрофобного кора молекулы.

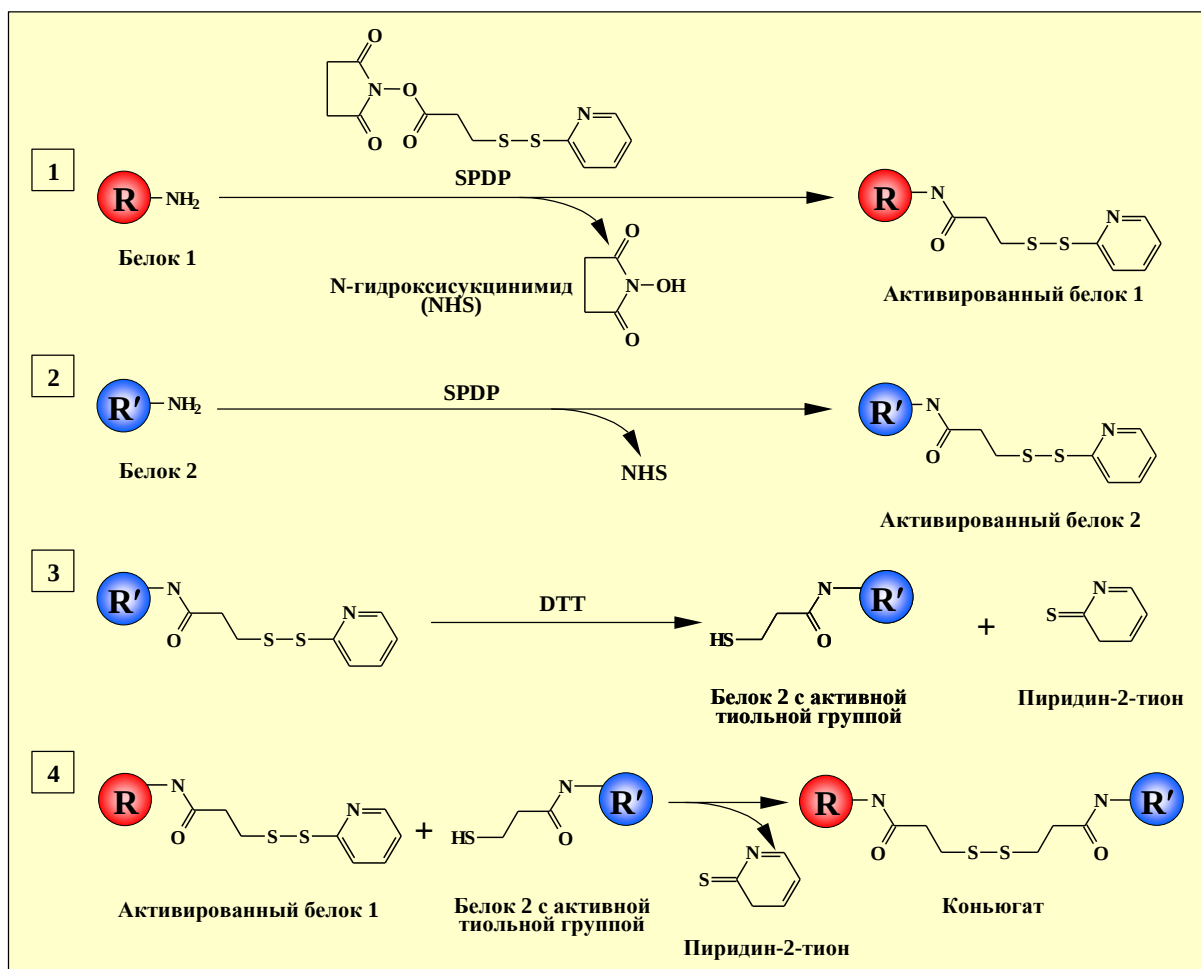


Рис. 42. Получение с помощью гетеробифункционального кросс-линкера SPDP конъюгата белков со свободными аминогруппами. Сначала производят активацию обоих белков реагентом SPDP (реакции 1 и 2). Затем один из белков обрабатывают восстанавливающим реагентом дитиотреитолом (DTT) (реакция 3). Далее проводят конъюгирование двух белков (реакция 4).

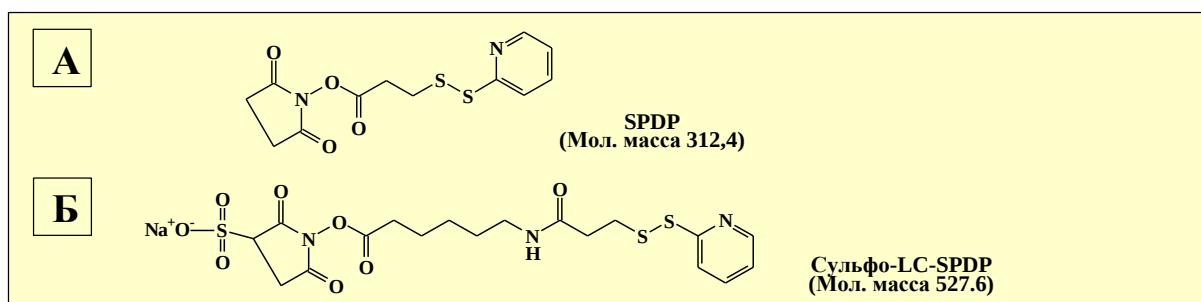


Рис. 43. Химическая структура гетеробифункционального кросс-линкера SPDP (А) и его водорастворимого аналога сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6-(3'-[2-пиридилдитио]-пропионамидо)гексаноат) с удлиненной спейсерной цепью (Б).

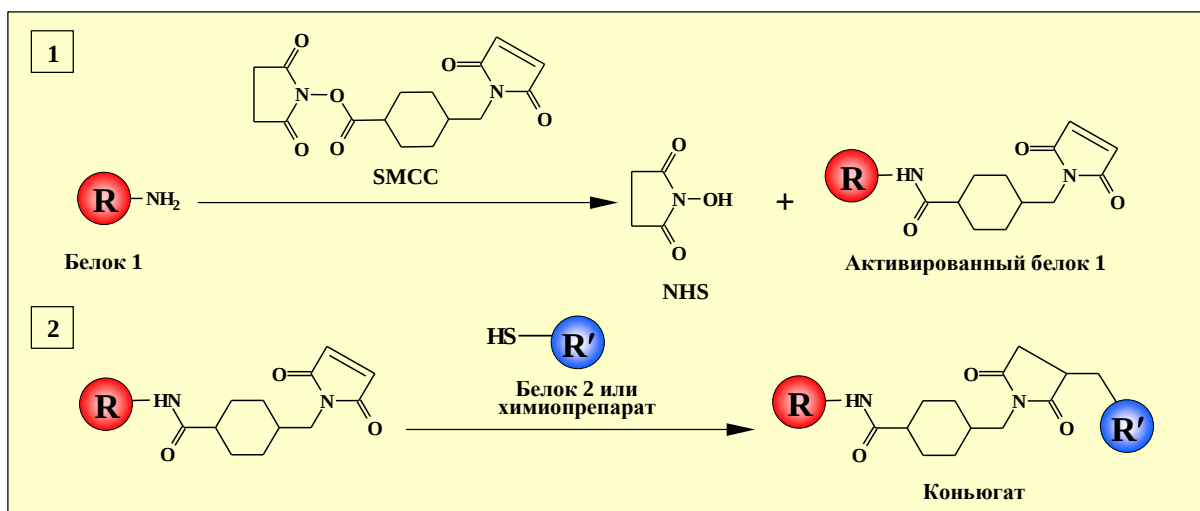


Рис. 44. Схема реакций получения конъюгатов соединений с амино- и тиольными группами с помощью гетеробифункционального кросс-линкера SMCC (сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат).

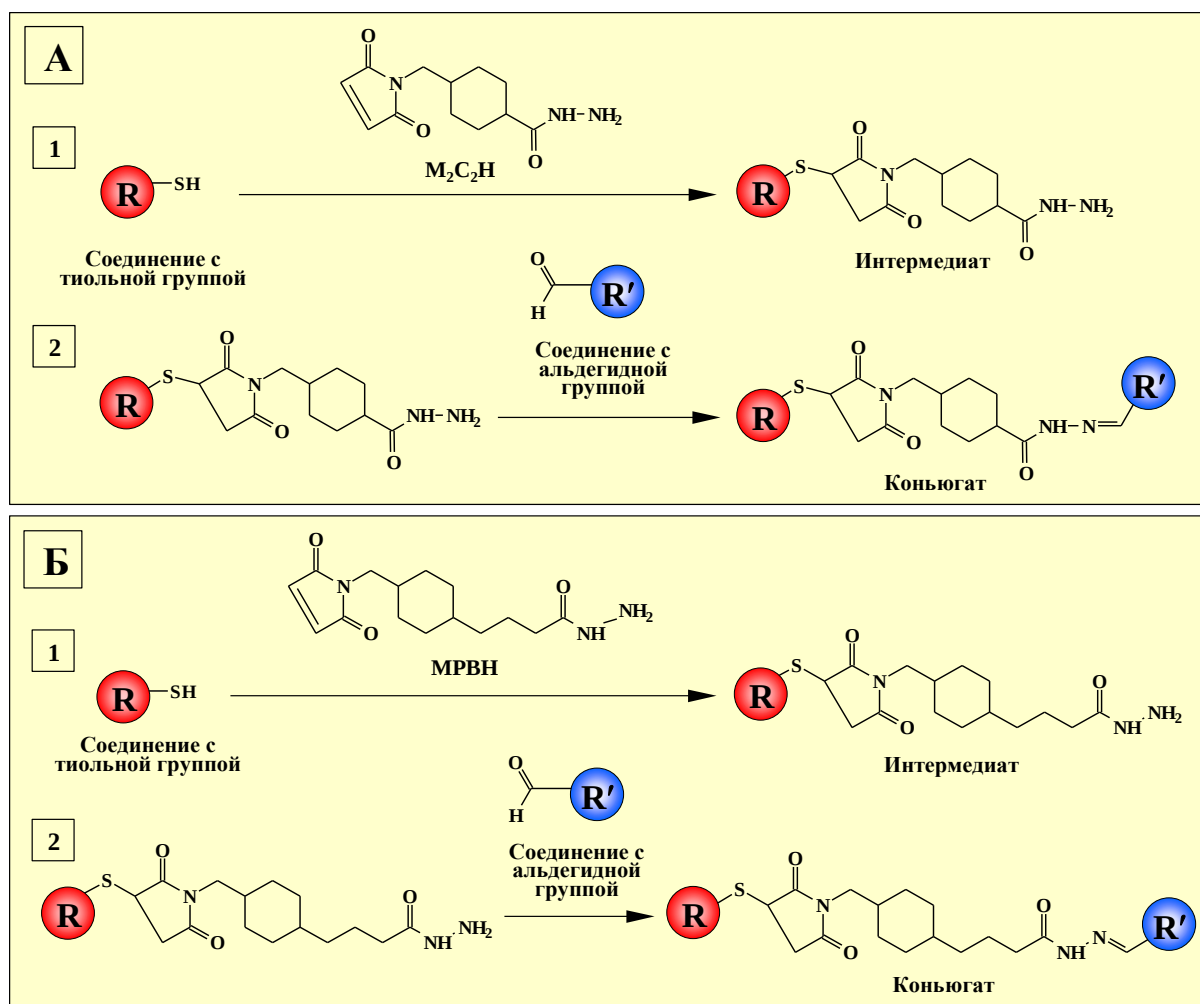


Рис. 45. Схема реакций получения конъюгатов соединений с тиольными и альдегидными группами с помощью гетеробифункциональных кросс-линкеров M_2C_2H (4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксил-гидразид) (А) и MPBH (4-(4-N-малеимидофенил)-гидразид масляной кислоты) (Б).

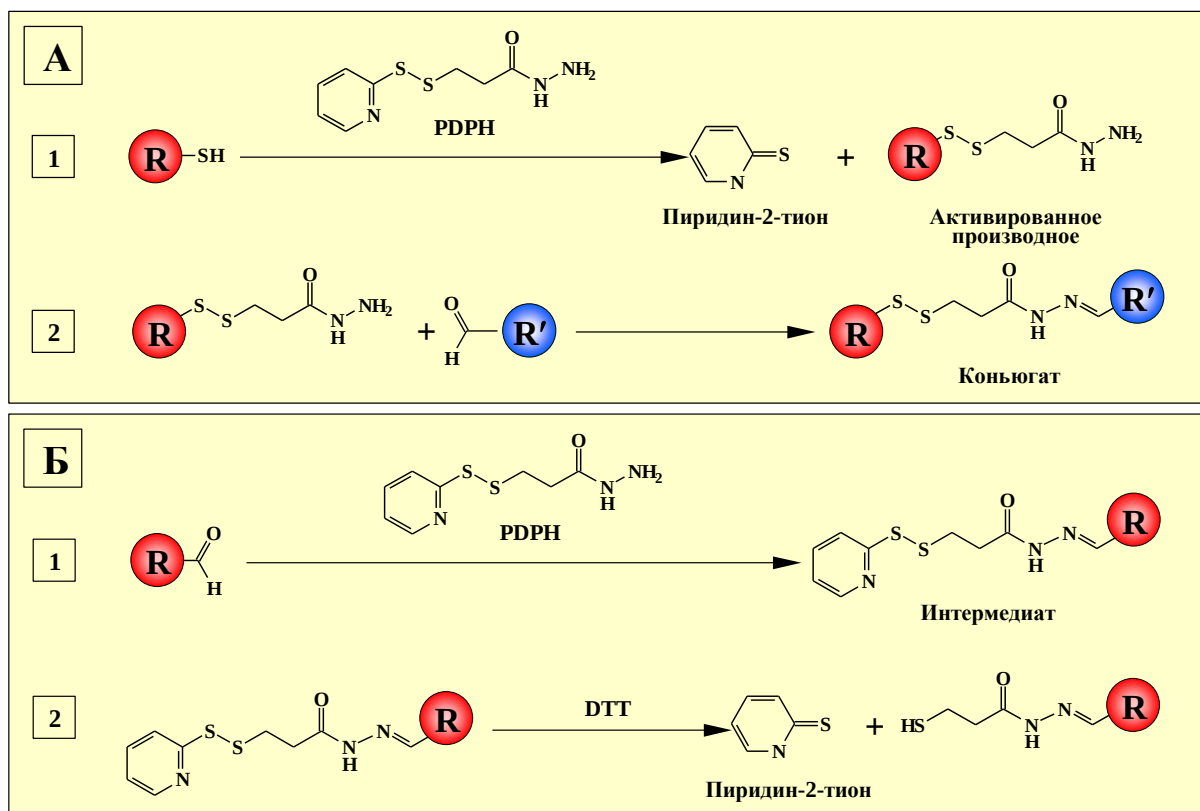


Рис. 46. Схема реакций получения конъюгатов соединений с тиольными и альдегидными группами с помощью гетеробифункционального кросс-линкера PDPH (3-(2-пиридилдитио)-пропионилгидразид) (А). Кросс-линкер PDPH также используют для введения тиольных групп в соединения с альдегидными группами (Б).

Помимо SPDP к широко применяемым для конъюгирования белков гетеро-БКЛ относится SMCC (сукцинимидил-1,4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат) и его водорастворимый аналог сульфо-SMCC. Концевые части молекулы SMCC активированы, и при конъюгировании один из концов кросс-линкера взаимодействует с аминогруппами белков с образованием амидной связи, а другой – с тиольными группами с образованием прочной тиоэфирной связи (рис. 44). Обычно сначала с помощью SMCC производят модификацию белка по аминогруппам, очищают интермедиат от избытка кросс-линкера и производят конъюгирование, добавляя к активированному белку соединения, имеющие свободные тиольные группы.

Из наиболее известных представителей гетеро-БКЛ, осуществляющих конъюгирование белков и других соединений, имеющих свободные amino- и тиольные группы, следует также отметить: SIAC – сукцинимидил-4-(((иодацетил)амино)метил)-циклогексан-1-карбоксилат; SMPB – сукцинимидил-4-(*n*-малеимидофенил)бутират); SMBS – N-(γ -малеимидобутирилокси)сукцинимидный эфир.

Важной группой гетеробифункциональных реагентов являются также кросс-линкеры, осуществляющие конъюгирование белков и других соединений, имеющих карбонильные и тиольные группы. К наиболее известным представителям этой группы относятся кросс-

линкеры M_2C_2H – 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксил-гидразид, MPBH – 4-(4-N-малеимидофенил)-гидразид масляной кислоты, PDPH – 3-(2-пиридилдитио)-пропионилгидразид, содержащие на одном конце молекулы гидразидную группировку, вступающую в реакцию с альдегидными группами, а на другом – малеимидную группировку, реагирующую с тиольными группами (рис. 45, 46).

Трифункциональные кросс-линкеры

Кросс-линкеры этой группы содержат в своей структуре три разные активные концевые группировки, позволяющие получать конъюгаты сразу трех соединений. Примером трифункциональных кросс-линкеров может служить сульфо-SBED – сульфосукцинимидил-2-[6-(биотинамидо)-2-(*p*-азидобензамидо)-гексанамидо]-этил-1,3'-дитиопропионат. Сульфо-SBED представляет собой вещество трискелетной структуры, каждая из ветвей которого содержит концевые активные группировки, способные реагировать с белками и другими соединениями (рис. 47). Сульфо-гидроксисукцинимид-эфирная группировка молекулы кросс-линкера путем взаимодействия с аминогруппами обеспечивает образование прочной амидной связи с белками или другими молекулами. Фенилазидная фоточувствительная группировка активируется при облучении УФ-светом ($\lambda > 300$ нм), после чего приобретает способность к взаимодействию с аминогруппами вещества, которое требуется ввести в состав конъюгата. Наконец, остаток биотина, входящий в состав кросс-линкера, может быть использован для очистки конъюгата на носителе с иммобилизованным авидином или стрептавидином. Остаток биотина также может быть использован для детекции конъюгата после его связывания с меченым (например, флуоресцентно) авидином. Авидин представляет собой тетрамерный гликопротеин (мол. масса ~ 66 кДа) из яичного белка (стрептавидин – его бактериальный аналог), имеющий четыре центра прочного ($K_D = 10^{-15}$ М) связывания с биотином (витамином Н).

Поскольку трифункциональные кросс-линкеры способны связывать сразу три разные молекулы конъюгируемых веществ, их использование для создания диагностических систем и отличающихся полифункциональностью терапевтических препаратов направленного действия представляется весьма актуальным.

Реагенты для флуоресцентного мечения

Для детектирования, идентификации, очистки, создания различных диагностических систем, изучения тканевого и внутриклеточного распределения, исследования фармакокинетики белков и других молекул часто прибегают к введению в их состав флуоресцентных, хромогенных, радиоактивных и иных меток.

Наиболее известным и широко применяемым реагентом для флуоресцентного мечения белков является FITC – флуоресцеинизотиоцианат (рис. 48). Этот реагент используют для модификации ε - и N-концевых аминокислотных групп белков. В водных растворах изотиоцианатная группировка довольно быстро деградирует, поэтому перед добавлением в

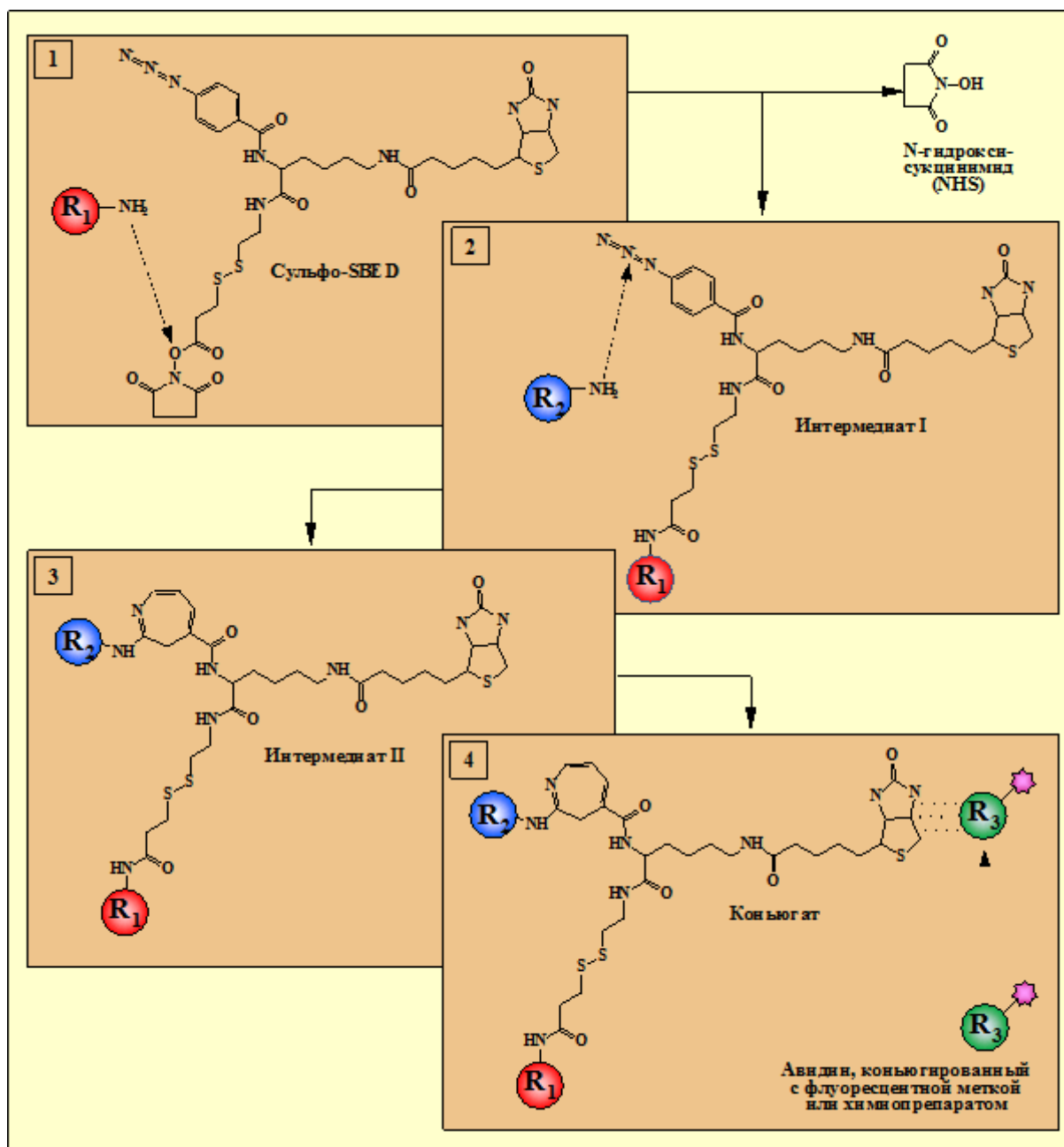


Рис. 47. Получение конъюгата трех различных соединений (R_1 , R_2 , R_3) с помощью трифункционального кросс-линкера сульфo-SBED (сульфо-N-гидроксисукцинимидил-2-(6-[биотинамидо]-2-(*n*-азидобензамидо)-гексанамидо)-этил-1,3'-дитиопропионат).

реакционную смесь FITC растворяют в диметилформамиде. Для конъюгатов белков с реагентом FITC характерная длина волны возбуждения составляет 495 нм, а эмиссии – 520 нм. Поскольку при конъюгировании белка с реагентом FITC часто наблюдается гашение флуоресценции, можно использовать другие реагенты, например NHS-LC-флуоресцеин (6-(флуоресцеин-5-карбоксамидо)сукцинимидный эфир капроевой кислоты), имеющий достаточно длинную линкерную цепочку и позволяющий пространственно удалить белок от

флуоресцентной метки в конъюгате и таким образом снизить эффект гашения флуоресценции (рис. 49).

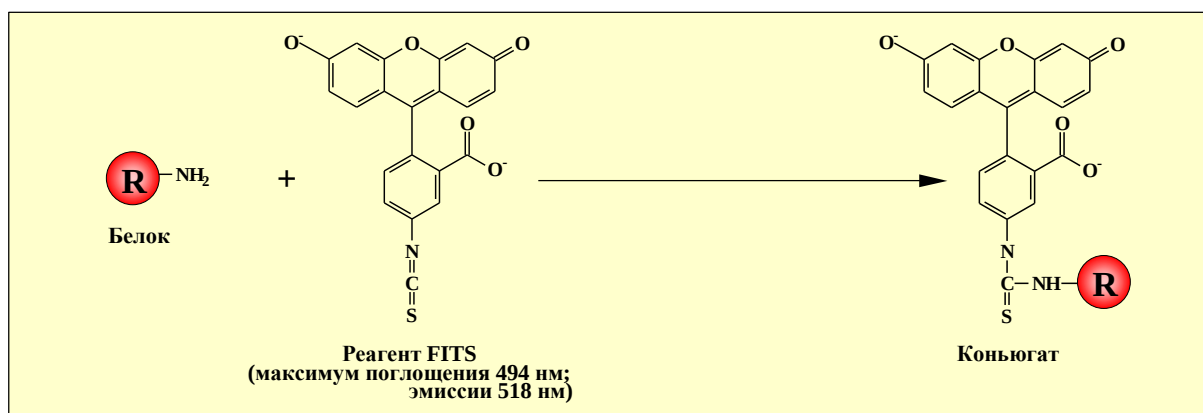


Рис. 48. Схема реакции получения конъюгата белка с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC).

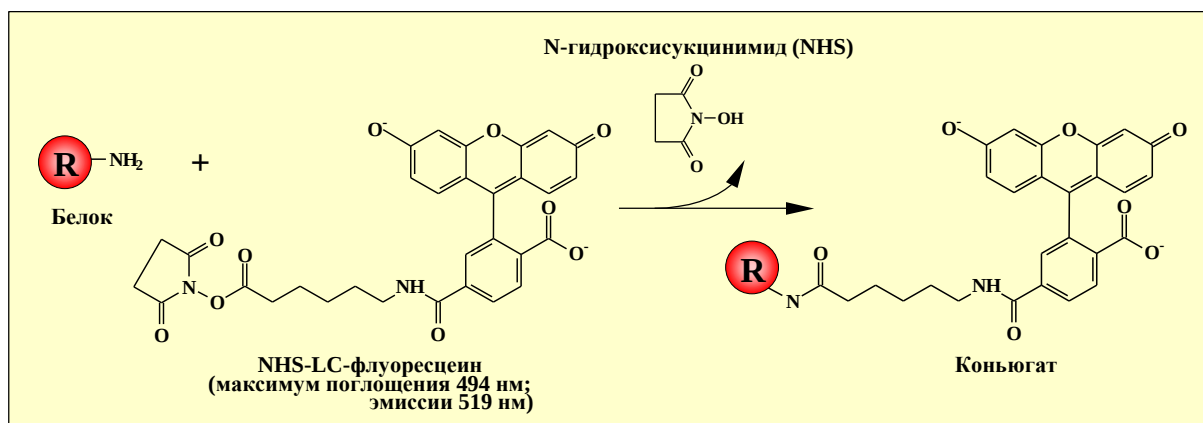


Рис. 49. Схема реакции получения конъюгата белка с реагентом NHS-LC-флуоресцеином (6-(флуоресцеин-5-карбоксамидо)-сукцинимидный эфир капроевой кислоты). Реагент отличается удлиненной линкерной группой, образованной остатком капроевой кислоты. Линкер позволяет пространственно удалить друг от друга белок и флуоресцентную метку и избежать гашения флуоресценции, наблюдаемого при их сближении.

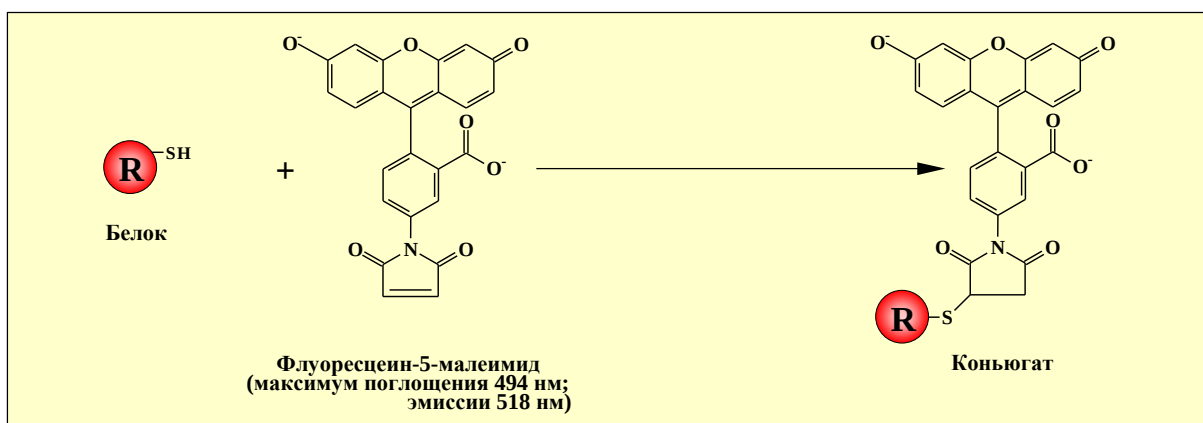


Рис. 50. Флуоресцентное мечение белка с помощью реагента флуоресцеин-5-малеимида.

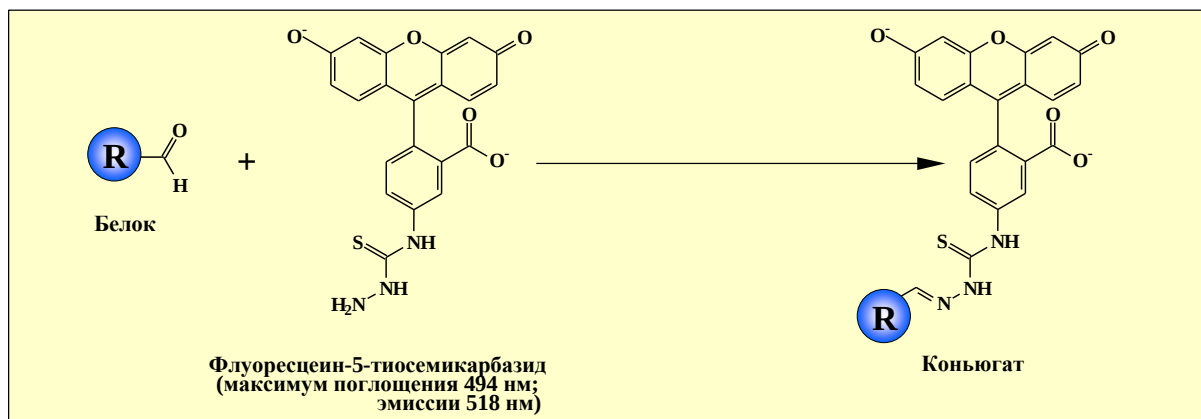


Рис. 51. Флуоресцентное мечение белка с помощью реагента флуоресцеин-5-тиосемикарбазид.

Присоединение флуоресцентных меток может также производиться по тиольным группам белков. Для этого используют реагент флуоресцеин-5-малеимид, содержащий малеимидную группировку, способную вступать в реакцию с тиольными группами с образованием стабильных тиоэфирных связей (рис. 50). Для конъюгатов, полученных с помощью флуоресцеин-5-малеимида, характерные длины волн возбуждения и эмиссии составляют 490 нм и 515 нм, соответственно.

Введение флуоресцентных меток в состав белков и других соединений, содержащих альдегидные или кетогруппы, осуществляют с помощью гидразидного производного флуоресцеина – флуоресцеин-5-тиосемикарбазид (рис. 51). В получаемом с помощью этого реагента конъюгате белок и флуоресцентная метка связаны ковалентной гидразоновой связью.

Помимо уже перечисленных реагентов хорошими флуоресцентными свойствами также обладают производные кумарина (кумарин – 9,10-бензо- α -пирон). Природный кумарин содержится в доннике белом, лаванде (масле) и бобах тонка – плодах южноамериканского дерева, используемых в качестве заменителей ванили. Производные 7-амино-4-метилкумарина обладают интенсивной флуоресценцией в области спектра видимого света (рис. 52). Для флуоресцентного мечения белков используют производное кумарина – реагент АМСА (7-амино-4-метилкумарин-3-ацетат), который поглощает свет с длиной волны 345 нм и люминесцирует в диапазоне длин волн 440–660 нм (рис. 52, 53 А). Аминореактивное производное АМСА – АМСА-NHS (сукцинимидил-7-амино-4-метилкумарин-3-ацетат) – также широко применяют для введения флуоресцентной метки в

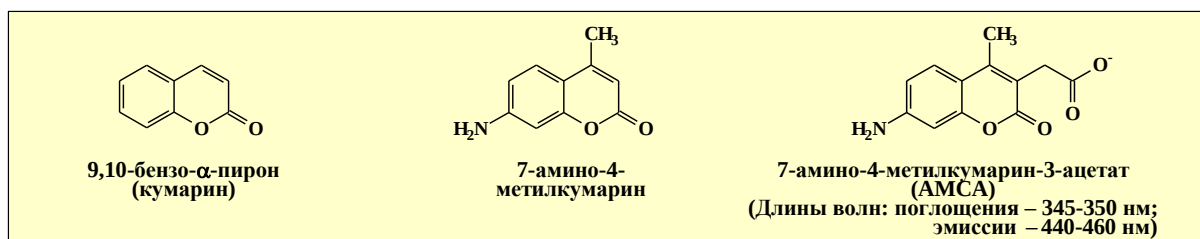


Рис. 52. Кумарин и его производные.

белки (рис. 53 Б). В некоторых случаях этот реагент удобнее применять, поскольку он не требует использования гомобифункциональных кросс-линкеров, а непосредственно вступает в реакцию с аминогруппами белка с образованием конъюгатов.

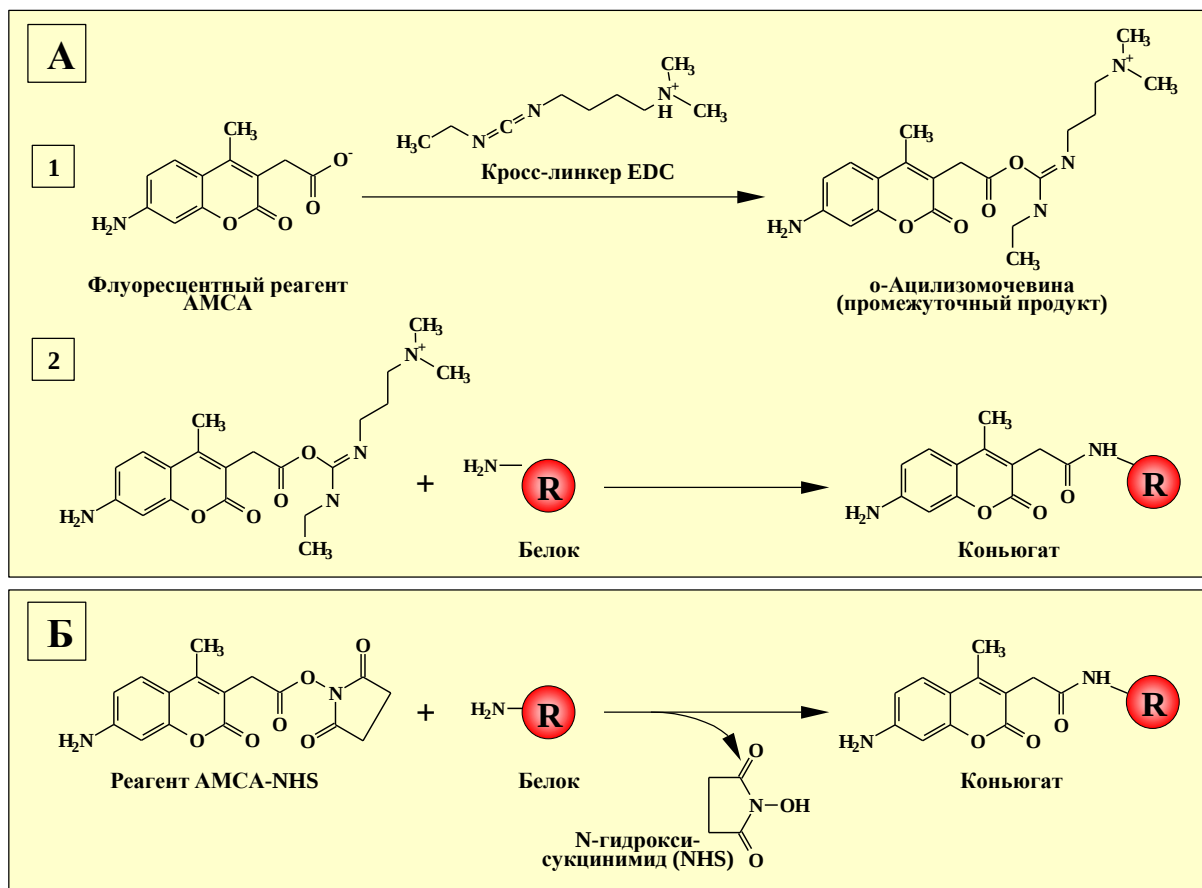


Рис. 53. Схемы реакций флуоресцентного мечения белков с помощью производных кумарина. А. Реагент АМСА (7-амино-4-метилкумарин-3-ацетат) после предварительной модификации, проводимой с помощью кросс-линкера «нулевой длины» EDC, может быть присоединен к белку через аминогруппы. Б. Реагент АМСА-NHS (сукцинимидил-7-амино-4-метилкумарин-3-ацетат) может непосредственно присоединяться к белкам путем взаимодействия N-сукцинимидо-эфирной группировки с аминогруппами белка с образованием прочной амидной связи.

Реагенты для радиоактивного мечения

Меченные радиоактивными изотопами моноклональные антитела и другие векторные белки, обладающие высоким сродством к рецепторам, локализованным на поверхности опухолевых клеток, могут быть использованы как для диагностики онкологических заболеваний, так и для их терапии. Для мечения белков широко применяются такие изотопы, как ^{10}B , $^{66,67}Ga$, $^{88,90}Y$, $^{111,115}In$, $^{125,131}I$, ^{212}Bi и др.

Для введения в белки изотопов иода ^{125}I и ^{131}I чаще всего используют реагент хлорамина Т (N-хлортолуолсульфамид натрия). В этом случае производится прямое мечение

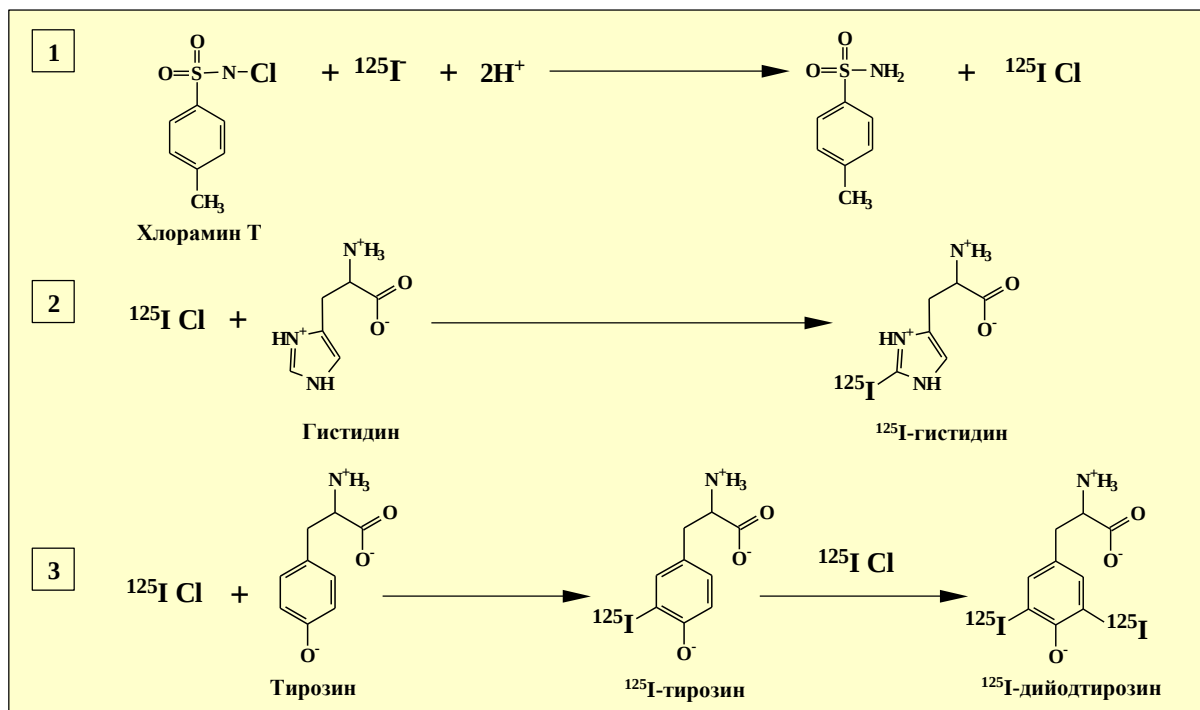


Рис. 54. Схема реакций мечения белков изотопами йода (^{125}I , ^{131}I) с помощью хлорамина Т. В водных растворах сильный окислитель хлорами́н Т реагирует с анионом $^{125}\text{I}^-$ с образованием высокореакционноспособной смеси $^{125}\text{I}^-\text{Cl}^+$ (1). Далее происходит модификация белков по остаткам гистидина (2) и тирозина (3) с образованием продуктов, меченных радиоактивным йодом.

белка изотопом без введения в его состав дополнительных групп. Радиоактивный йод может включаться в белок по остаткам тирозина и гистидина. Обычно для этого используют иодид натрия Na^{125}I , в котором йод присутствует в виде аниона I^- , а для замещения протона в бензольном кольце тирозина путем электрофильной атаки необходим катион I^+ . Для осуществления перехода I^- в I^+ используют сильный окислитель хлорами́н Т. Результатом образования катиона I^+ является иодирование белков по остаткам тирозина или гистидина (рис. 54).

Для введения радиоактивных изотопов в белки также применяют методы непрямого мечения, при которых белки модифицируют с помощью бифункциональных хелатирующих реагентов, способных образовывать с ионами металлов комплексные соединения. К таким реагентам относятся диэтилентриаминпентауксусная кислота (ДТРА) и ее ангидрид. ДТРА связывается с белками посредством слабых ионных взаимодействий. Для получения стабильных конъюгатов используют диэтилентриаминпентауксусный ангидрид, который содержит две ангидридные группировки, способные вступать в реакцию с N-концевыми и ε-аминогруппами белков с образованием прочных амидных связей. При этом ангидридные кольца раскрываются с образованием мультивалентных сайтов, способных прочно связывать ионы металлов, образуя с ними хелатные («клешневидные») комплексные соединения (рис. 55). Для введения радиоактивных меток в белки также можно использовать реагенты

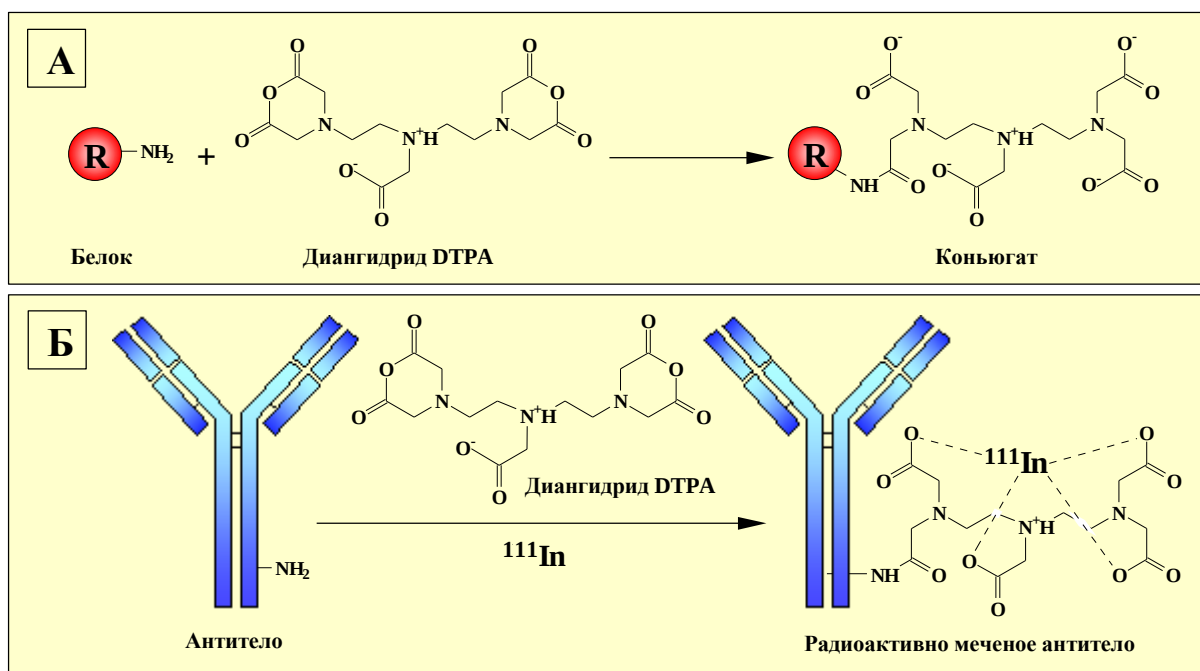


Рис. 55. Схема реакции модификации белков с помощью бифункционального хелатирующего реагента – диангидрида ДТРА (диангидрид диэтилентриаминпентауксусной кислоты). А. Реагент связывается с белком посредством амидной связи. Модифицированный белок приобретает способность к связыванию ионов радиоактивных изотопов металлов. Б. Модификация антител с помощью диангидрида ДТРА с последующим присоединением радионуклида ^{111}In . Радиоактивно меченые антитела могут быть использованы в качестве диагностического средства или противоопухолевого препарата направленного действия, в котором антитело выполняет роль векторной молекулы, распознающей специфический антиген на поверхности опухолевой клетки.

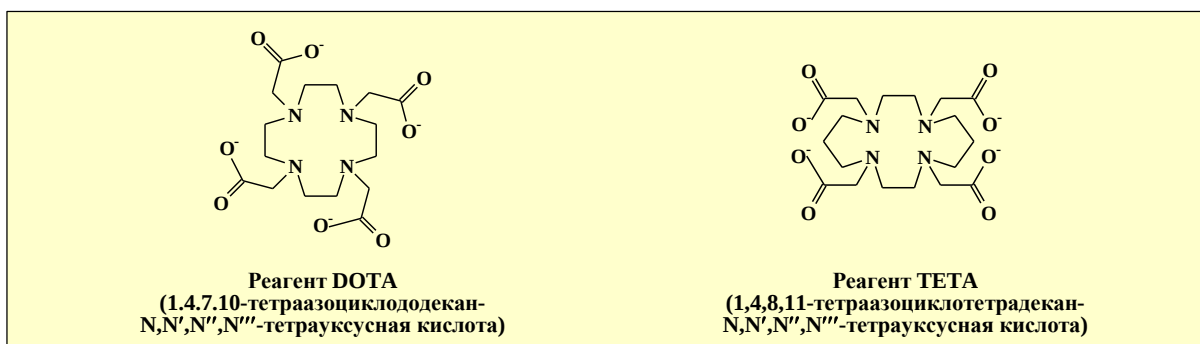


Рис. 56. Химические структуры хелатирующих реагентов DOTA и TETA, применяемых для радиоактивного мечения белков.

DOTA (1,4,7,10-тетраазаациклододекан- $\text{N},\text{N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -тетрауксусная кислота) и TETA (1,4,8,11-тетраазаациклотетрадекан- $\text{N},\text{N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -тетрауксусная кислота) (рис. 56), которые для связывания с белками предварительно модифицируют по одной из карбоксильных групп с помощью подходящих кросс-линкеров. В своем составе каждый из описываемых реагентов содержит кольцевую структуру с четырьмя хелатирующими группировками. Внутри этой

кольцевой структуры располагаются ионы металлов. В результате взаимодействия реагентов DOTA и TETA с ионами радиоактивных металлов образуются комплексные соединения, отличающиеся высокой стабильностью, что особенно важно при применении таких комплексов в медицине для диагностики и терапии онкологических заболеваний.

Реагенты для биотинилирования

Способность к высокоспецифичному нековалентному взаимодействию гликопротеина авидина с биотином может быть использована при разработке различных диагностических систем и терапевтических препаратов направленного действия. В настоящее время авидин-биотиновая система широко применяется в иммуноферментном анализе и анализах гибридизации ДНК, при иммуногистохимическом окрашивании, иммунопреципитации, иммуноблоттинге («Western blotting»), очистке белков с помощью аффинной хроматографии и др.

Конъюгаты биотина с белком могут быть получены с помощью кросс-линкера «нулевой длины» EDC (рис. 57), однако чаще для этого используют специальные биотинилирующие реагенты, содержащие остаток биотина. Существуют биотинилирующие реагенты, способные образовывать ковалентные связи при взаимодействии с amino-, thiol-, carboxyl- and carbonyl- groups of proteins. Биотинилирующие реагенты с расщепляемым линкерным участком могут применяться для облегчения хроматографической очистки белков. В этом случае биотинилированный белок пропускают через колонку с хроматографическим носителем, на котором иммобилизован авидин. Биотинилированный белок прочно связывается с носителем. Посторонние примеси удаляют путем промывания колонки. Для элюирования белка колонку заполняют буфером,

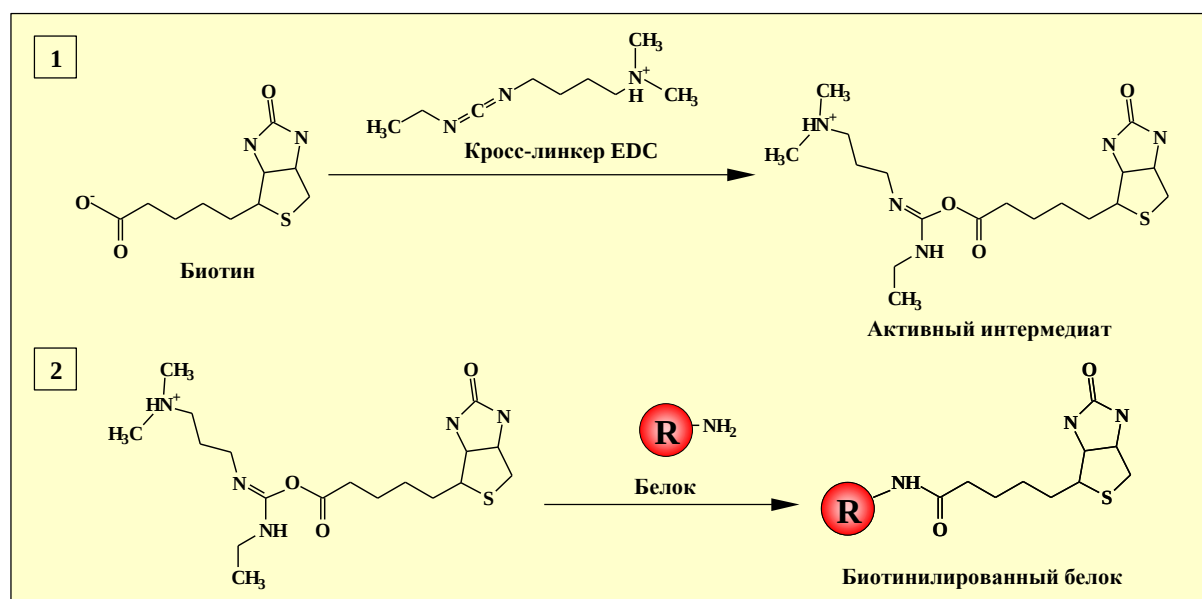


Рис. 57. Схема реакции биотинилирования белка, осуществляемого с помощью водорастворимого карбодиимида (EDC).

содержащим меркаптоэтанол, расщепляющий дисульфидную связь в линкерной цепочке, соединяющей белок с биотином. В результате белок отделяется от носителя и элюируется с колонки в очищенном состоянии. Обычно реагенты, предназначенные для биотинилирования белков, содержат на одном конце молекулы активную группу, способную присоединяться к белку, а на другом – бициклическое биотиновое кольцо, связанное с линкером через остаток валериановой кислоты. Простейшим реагентом для биотинилирования белков является NHS-биотин (NHS от англ. *N*-hydroxysuccinimide)

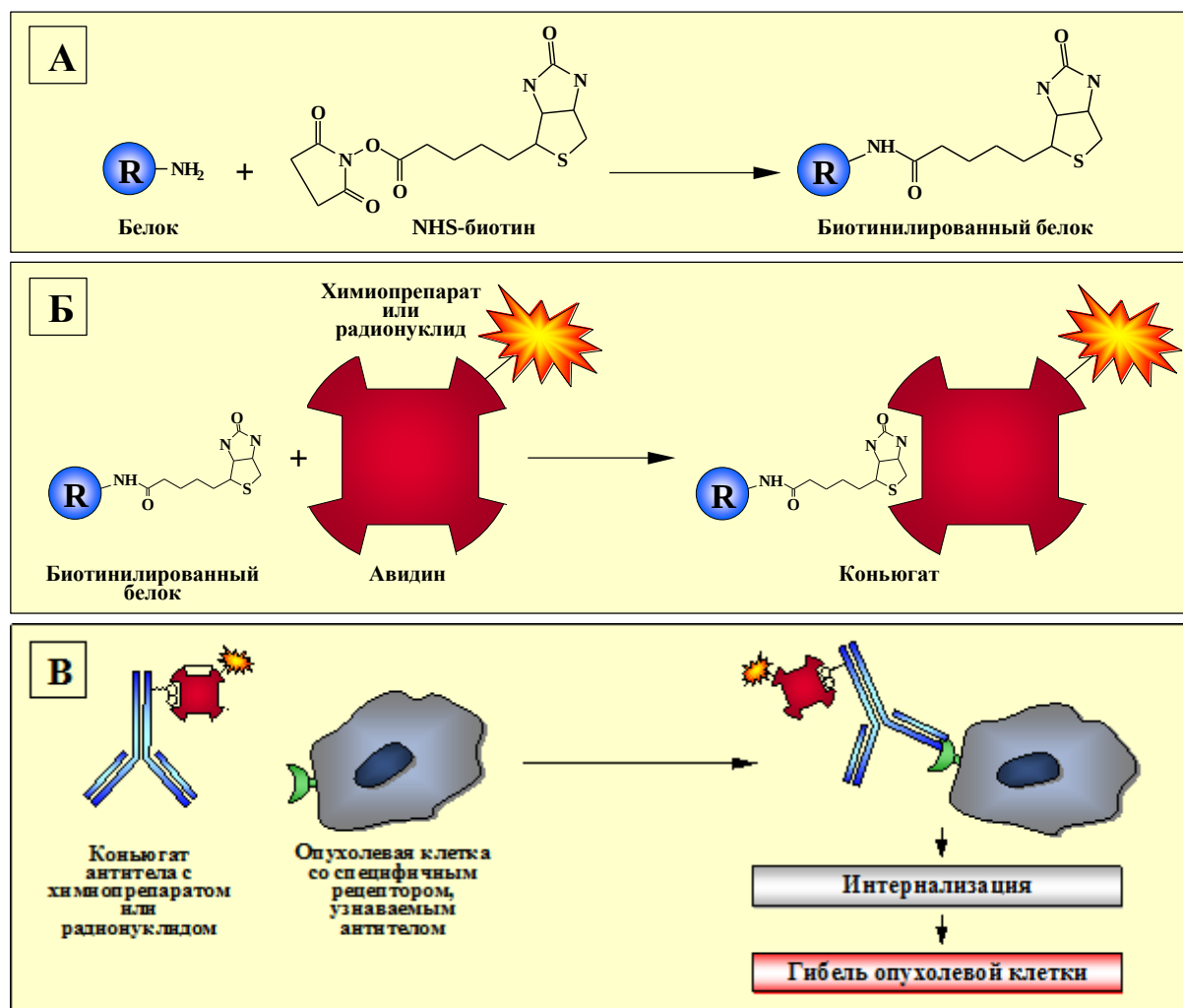


Рис. 58. Биотинилирование белков и использование нековалентных конъюгатов антител с меченым авидином для поражения опухолевых клеток. А. Схема реакции биотинилирования белка с помощью реагента NHS-биотин. Б. Прочное ($K_d=10^{-15}$ М) нековалентное присоединение конъюгата авидина (имеющего 4 сайта связывания с биотином) с химиопрепаратом к биотинилированному белку. В. Если в качестве биотинилированного белка использовать моноклональные антитела или факторы роста, узнающие специфические рецепторы на поверхности опухолевых клеток, можно получить терапевтический препарат направленного действия, осуществляющий избирательную доставку химиопрепарата в опухолевые клетки-мишени. После связывания конъюгата с рецептором клеточной поверхности происходит интернализация лиганд-рецепторного комплекса, в результате которой химиопрепарат оказывается внутри опухолевой клетки и вызывает ее гибель.

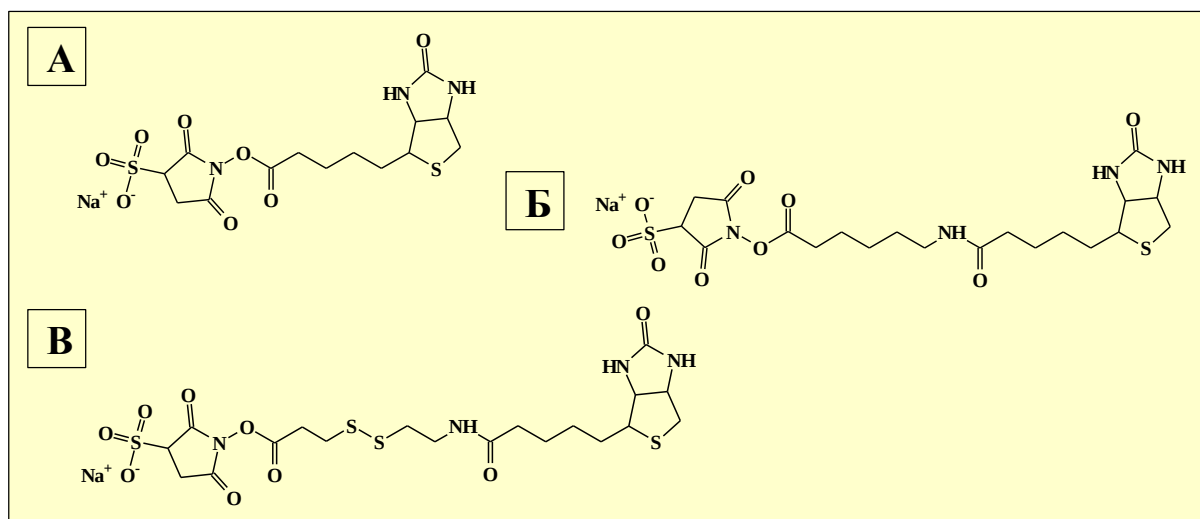


Рис. 59. Химические структуры реагентов для биотинилирования белков. А. Сульфо-NHS-биотин. Б. Сульфо-NHS-LC-биотин. В. Сульфо-NHS-SS-биотин.

(рис. 58). Этот реагент нерастворим в водных средах, поэтому перед добавлением в реакционную смесь его растворяют в диметилсульфоксиде. Для биотинилирования белков также часто применяют реагент сульфо-NHS-биотин (рис. 59 А), который водорастворим в отличие от NHS-биотина. Благодаря наличию отрицательного заряда реагент не проникает в клетки через плазматическую мембрану, что позволяет использовать его для биотинилирования мембранных белков. Водорастворимый реагент сульфо-NHS-LC-биотин (рис. 59 Б) отличается более длинной линкерной цепочкой, позволяющей пространственно удалить белок и биотин и снять стерические препятствия (если они существуют) на пути проявления функциональной активности конъюгата. Этот реагент часто используют для биотинилирования белков клеточной поверхности. Реагент сульфо-NHS-SS-биотин (рис. 59 В) отличается наличием в линкерной цепи дисульфидной связи, которая создает возможности для обратимого биотинилирования. Это означает, что биотин может быть отделен от белка после расщепления дисульфидной связи, например, с помощью дитиотреитола.

Таким образом, даже беглый обзор существующих реагентов для модификации белков позволяет оценить широкие возможности, предоставляемые экспериментаторам для получения конъюгатов и модифицированных белков самого разнообразного назначения. Одним из важнейших направлений современной нанобиотехнологии является разработка терапевтических препаратов направленного действия. Векторный компонент таких препаратов представляет собой антитело или белок, узнающие специфические рецепторы на поверхности тканей-мишеней. К векторному компоненту могут быть химически присоединены различные терапевтические агенты, и полученные таким образом препараты должны обладать высокой избирательностью и эффективностью действия. Разработка новых препаратов направленного действия и стратегий их применения представляется актуальной задачей, решение которой позволит значительно повысить потенциал различных областей современной медицины.

КОНЬЮГАТЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ

Становление и развитие концепции «магической пули»

Еще в начале прошлого века лауреатом Нобелевской премии (1908 г.) в области иммунологии немецким врачом и иммунологом Паулем Эрлихом (1854–1915 г.г.) (рис. 60) была высказана идея о возможности создания препарата, определенного им как «магическая пуля», который мог бы отыскать и избирательно уничтожить причину болезни [81]. Пауль Эрлих также высказал предположение, что на протяжении жизни у человека постоянно возникают «аномальные зачатки» опухолей, которые развиваются в смертельное заболевание, если по каким-то причинам эти зачатки не будут устранены иммунной системой. Эта гипотеза послужила основой для формирования представлений об опухоли как о структуре, подобной тканевым трансплантатам, которые могут распознаваться и отторгаться иммунной системой. На основании идеи об иммунном ответе, возникающем при появлении «аномальных зачатков», ученый Ф. Бёрнет создал теорию иммунологического надзора, согласно которой иммунная система осуществляет постоянный надзор за появлением в организме трансформированных клеток, распознает и разрушает их [33]. Впоследствии выяснилось, что на появление в организме большинства опухолей развивается относительно поздний и неэффективный иммунный ответ. В течение ряда лет учеными предпринимались попытки использовать антитела для борьбы с опухолями, и к 70-м годам прошлого столетия стало очевидным, что иммуноглобулины могут применяться для подавления опухолевого роста. В дальнейшем в результате интеграции и координации усилий ученых, представляющих различные научные дисциплины, такие, как биология клетки, химия, биотехнология и нанотехнология, наметился значительный прогресс в решении проблем, связанных с реализацией идеи П. Эрлиха о «магической пуле» и ее

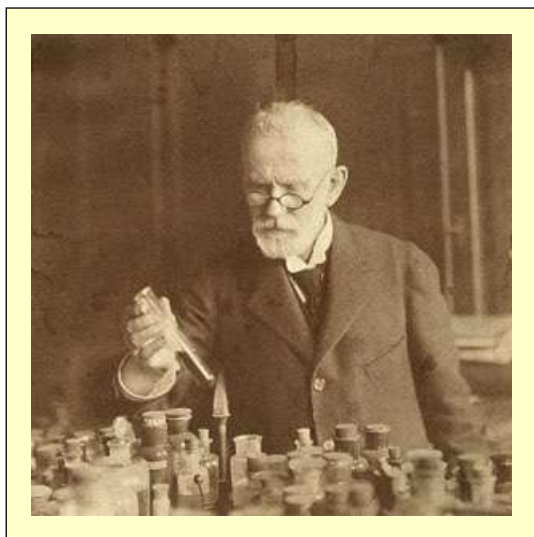


Рис. 60. Автор идеи о «магической пуле» Лауреат Нобелевской премии в области иммунологии немецкий врач и иммунолог Пауль Эрлих (1854–1915).

воплощением в виде современной концепции направленной доставки терапевтических агентов к тканям-мишеням. Развитие молекулярной биологии и совершенствование методов генетической инженерии, в свою очередь, позволило быстро идентифицировать и клонировать гены антител и разъяснить механизмы, лежащие в основе их разнообразия.

Особенно интенсивно концепция «магической пули» начала развиваться после разработки технологии получения моноклональных антител. К середине 70-х годов XX века усилиями ученых Г. Кёлера и С. Мильштейна была продемонстрирована возможность применения гибридизации соматических и опухолевых клеток для получения стационарных клонов гибридных

клеток («гибридом»), продуцирующих антитела [159]. С помощью гибридной технологии можно создавать иммортализованные (бессмертные) линии клеток, каждая из которых продуцирует индивидуальные антитела только одной определенной специфичности (моноклональные антитела) (рис. 61). Для иммортализации продуцирующие антитела В-клетки из селезенки гибридизуют путем слияния с миеломными В-клетками, полученными от мышей той же линии, но лишенными способности секретировать антитела, и такая клеточная культура может продуцировать антитела неопределенно долгое время. По сравнению с гетерогенными по составу антител сыворотками, получаемыми от иммунных животных, моноклональные антитела обладают высокой специфичностью и широко применяются как в различных видах иммуноанализа, так и в области создания препаратов направленного действия. Заслуги разработчиков технологии получения моноклональных антител высоко оценило научное сообщество, и в 1984 г. Г. Кёлеру и С. Мильштейну была присуждена Нобелевская премия за открытие и разработку принципов выработки моноклональных антител с помощью гибридом.

После получения с помощью гибридных технологий моноклональных антител к различным антигенам, присутствующим на поверхности опухолевых клеток, начался этап активной разработки технологий получения их конъюгатов с биологически активными веществами. Этому способствовали достижения в области химии, которые позволили осуществить синтез целого ряда кросс-линкеров, или «сшивающих» агентов. В результате были получены, очищены и исследованы конъюгаты моноклональных антител с различными биологически активными веществами и противоопухолевыми химиопрепаратами. В некоторых случаях в ходе испытаний противоопухолевых конъюгатов на лабораторных животных удавалось достигать значительных терапевтических эффектов. Таким образом, идея «магической пули», предполагавшая создание препарата, который мог бы отыскать и уничтожить очаг болезни, нашла свое практическое воплощение в препаратах направленного действия. В таких препаратах в качестве векторных компонентов, распознающих клетки-мишени, часто используются моноклональные антитела, которые посредством линкера связаны с терапевтическим агентом.

В настоящее время не только антитела, но и векторные белки, такие как эпидермальный фактор роста, альфа-фетопротеин, альбумин, трансферрин и др. используют для направленной доставки токсинов и химиопрепаратов в опухолевые клетки. Избирательность доставки в данном случае достигается за счет присутствия на поверхности клеточной мембраны специфических антигенов или аномально большого числа рецепторов, с которыми связывается векторный компонент конъюгата. После связывания конъюгата с опухолевой клеткой-мишенью химиопрепарат попадает внутрь путем рецепторопосредованного эндоцитоза и оказывает терапевтическое действие. Данный подход, основанный на представлениях о «магической пуле», представляет собой одно из наиболее перспективных направлений биотерапии рака. Следует учитывать, что при применении мышинных антител в составе конъюгата в организме быстро вырабатываются антитела против чужеродного комплекса, вызывающие его инактивацию и удаление из

системы циркуляции крови. Также при применении конъюгатов могут развиваться аллергические реакции, препятствующие дальнейшему проведению химиотерапии. Для

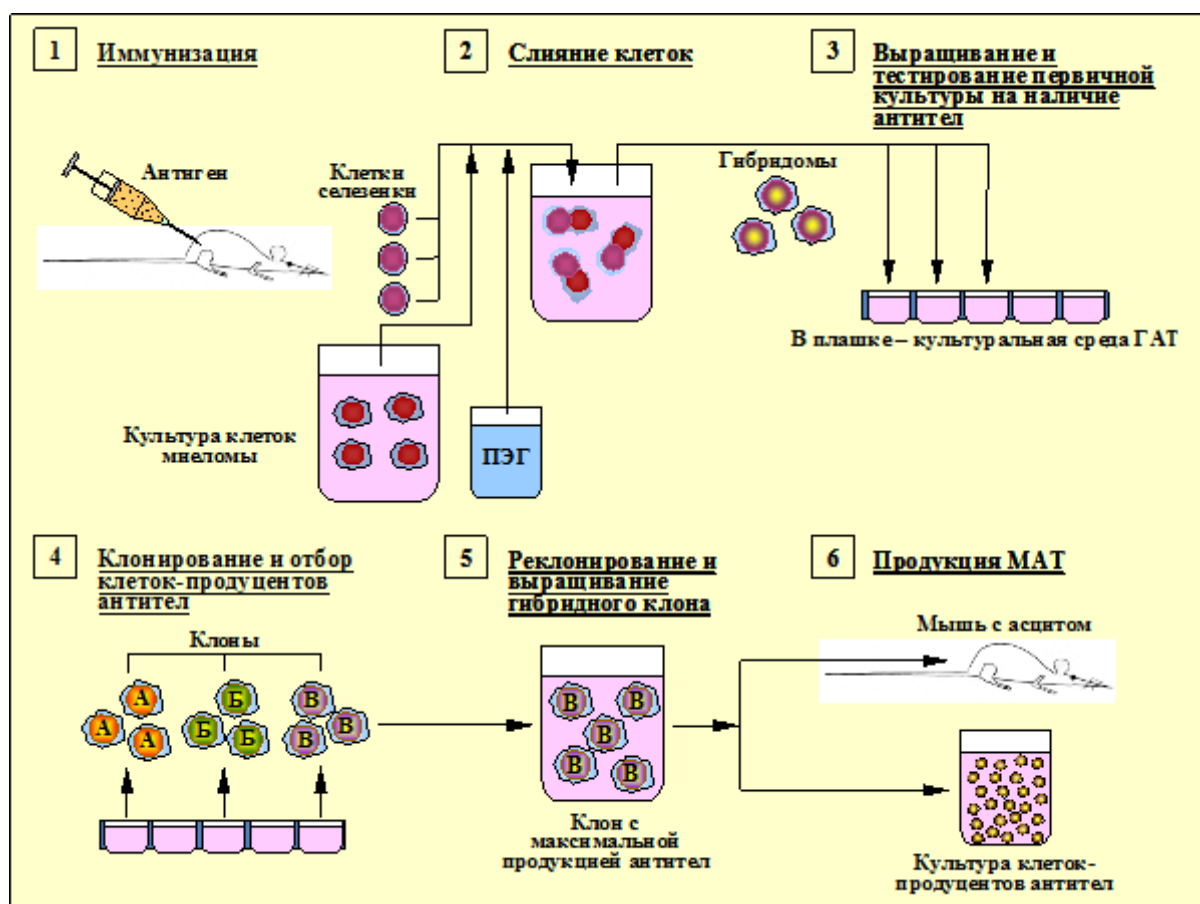


Рис. 61. Этапы процесса получения моноклональных антител с помощью гибридомной технологии. 1. Иммунизация животных выбранным антигеном и выделение лимфоцитов из лимфоузлов (чаще всего селезенки). 2. Слияние лимфоцитов с миеломными клетками в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ), способствующего слиянию. Получают гибридомные клетки, каждая из которых наследует от родительской плазматической клетки способность секретировать антитела, а от миеломной – способность к неограниченному делению. 3. Отбор продуктивных клеток при длительной инкубации первичной культуры в среде ГАТ, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин. Поскольку плазматические клетки представляют короткоживущую популяцию, они отмирают без дополнительных воздействий при культивировании. Для создания возможности удаления опухолевых миеломных клеток используют мутантные миеломные клетки, дефицитные по гипоксантинфосфорибозил-трансферазе (ГФТ) и тимидинкиназе (ТК), ответственным за запасной путь биосинтеза нуклеиновых кислот, в котором используются гипоксантин и тимидин. Поскольку в среде присутствует аминоптерин – ингибитор основного пути биосинтеза пуринов и пиримидинов, мутанты, не имеющие возможности синтезировать нуклеотиды, отмирают. Гибридные клетки, наследующие от родительской плазматической клетки гены ГФТ и ТК, продолжают жить и делиться. 4. Клонирование. Рассеивают гибридные клетки по лункам иммунологического планшета таким образом, чтобы в лунке оказался лишь один клон клеток. Тестируя антитела в культуральной среде с помощью нужного антигена, отбирают клоны, секретирующие антитела нужной специфичности. 5. Селекция и отбор клонов с высоким титром антител. 6. Нарботка моноклональных антител клетками отобранных клонов либо в биореакторе, либо в асцитной жидкости мыши.

преодоления этих затруднений средствами генной инженерии производят замену участков мышиного антитела фрагментами человеческого.

Как легкие, так и тяжелые цепи антител содержат константные и переменные участки последовательности, причем последние непосредственно участвуют в связывании антигена (рис. 62). Применяемые в настоящее время методы клонирования генов иммуноглобулинов человека, а также другие генно-инженерные технологии позволяют создавать гибридные антитела человека и мыши, отличающиеся от мышиных значительно более низкой иммуногенностью. Одним из видов гибридных антител являются химерные антитела, в которых константные участки имеют человеческое происхождение, а переменные происходят от мышиных антител. Химерные антитела представляют первое поколение гибридных антител (рис. 63). Второе поколение гибридных антител представлено гуманизированными антителами, в структуре которых лишь небольшие антигенсвязывающие последовательности переменных участков имеют мышиное происхождение (рис. 63). Главной задачей гуманизации является снижение иммуногенности антител и иммуноконъюгатов, которое позволяет успешно использовать их в противоопухолевой терапии.

Помимо гуманизации для снижения иммуногенности конъюгатов антител с токсинами или химиопрепаратами применяют модификацию антител синтетическими полимерами. Например, модификация антитела полиэтиленгликолем (с включением в его состав от 2 до 5 цепей полимера) резко снижает иммуногенность конъюгата и увеличивает время его циркуляции в крови.

В настоящее время для терапии онкологических заболеваний применяют как свободные антитела, так и их конъюгаты с токсинами (рис. 64 А) и химиопрепаратами (рис. 64 Б). Действие моноклональных антител, применяемых в онкологии, прежде всего направлено против специфичных для опухоли или ассоциированных с опухолевой тканью антигенов. Свободные антитела проявляют противоопухолевое действие либо путем блокирования рецепторов факторов роста и индукции апоптоза опухолевых клеток, либо путем связывания со специфическими антигенами и запуска собственных механизмов иммунного ответа. Поскольку факторы роста и их рецепторы активно экспрессируются и участвуют в аутокринной стимуляции роста опухолей, нарушение лиганд-рецепторных взаимодействий с помощью моноклональных антител является эффективным инструментом подавления злокачественного процесса. В данном случае применение антител будет направлено на подавление неконтролируемого опухолевого роста, вызванного нарушением нормальной регуляции пролиферации клеток. Не только свободные антитела, но и антитела, входящие в состав препарата направленного действия, способны распознавать опухолевые клетки. При этом антитела играют роль «магической пули», позволяющей препарату избирательно связываться с опухолевыми клетками [340]. Подобные препараты представляют собой конъюгаты моноклональных антител с токсинами или противоопухолевыми агентами. К сожалению, выявление на поверхности опухолевой клетки высокоспецифичных антигенов, связывание с которыми векторного компонента препарата

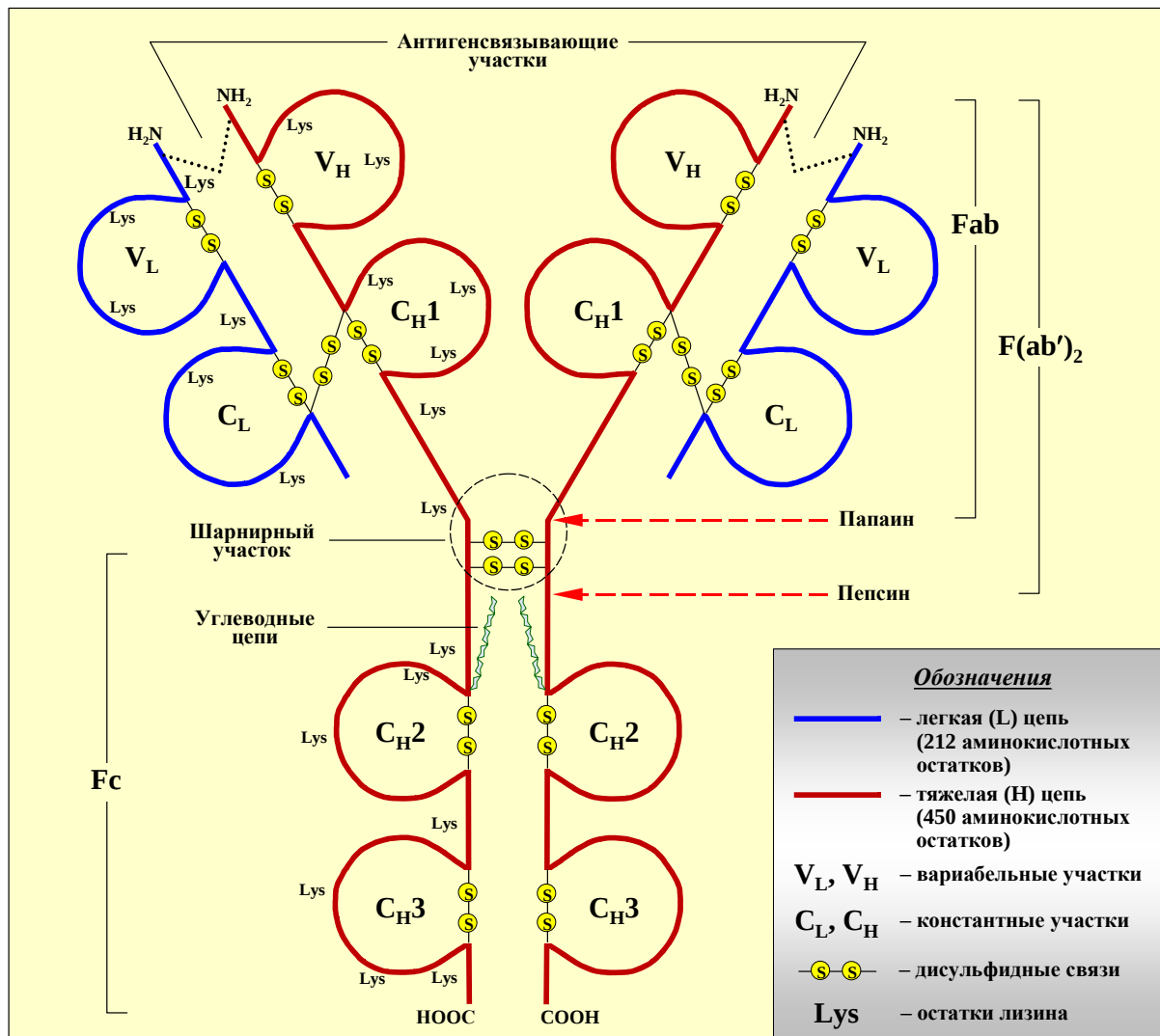


Рис. 62. Строение антитела (иммуноглобулина класса G (IgG)). Антитела, или иммуноглобулины, – гликопротеины, несущие по два антигенсвязывающих участка, локализованных в переменных доменах. Молекула антитела представляет собой тетрамер с мол. массой 150 кДа, включающий по две идентичных легких (L (от англ. light)) и тяжелых (H (от англ. heavy)) цепи. Каждая из тяжелых цепей несет по ковалентно связанному олигосахариду и состоит из четырех глобулярных доменов (V_H (от англ. variable), C_H1 , C_H2 , C_H3 (от англ. constant)). Каждая из легких цепей состоит из двух глобулярных доменов (V_L и C_L). Тяжелые цепи связаны между собой двумя дисульфидными связями. Каждая из легких цепей связана с тяжелой цепью одной дисульфидной связью. Внутримолекулярную подвижность антителам придает шарнирный участок, локализованный в центральной части молекулы. При расщеплении протеиназой папаином образуются два сохраняющих способность к связыванию антигена Fab-фрагмента (от англ. antigen-binding fragment) и фрагмент Fc (от англ. fragment crystallizable), отвечающий за связывание антитела с поверхностью клетки. Fab-фрагменты, как и само антитело, используют в качестве векторных молекул при получении препаратов направленного действия. В реакциях конъюгирования для связывания с химиопрепаратами чаще всего используют остатки лизина, локализованные в области Fc-фрагмента, или углеводные цепи.

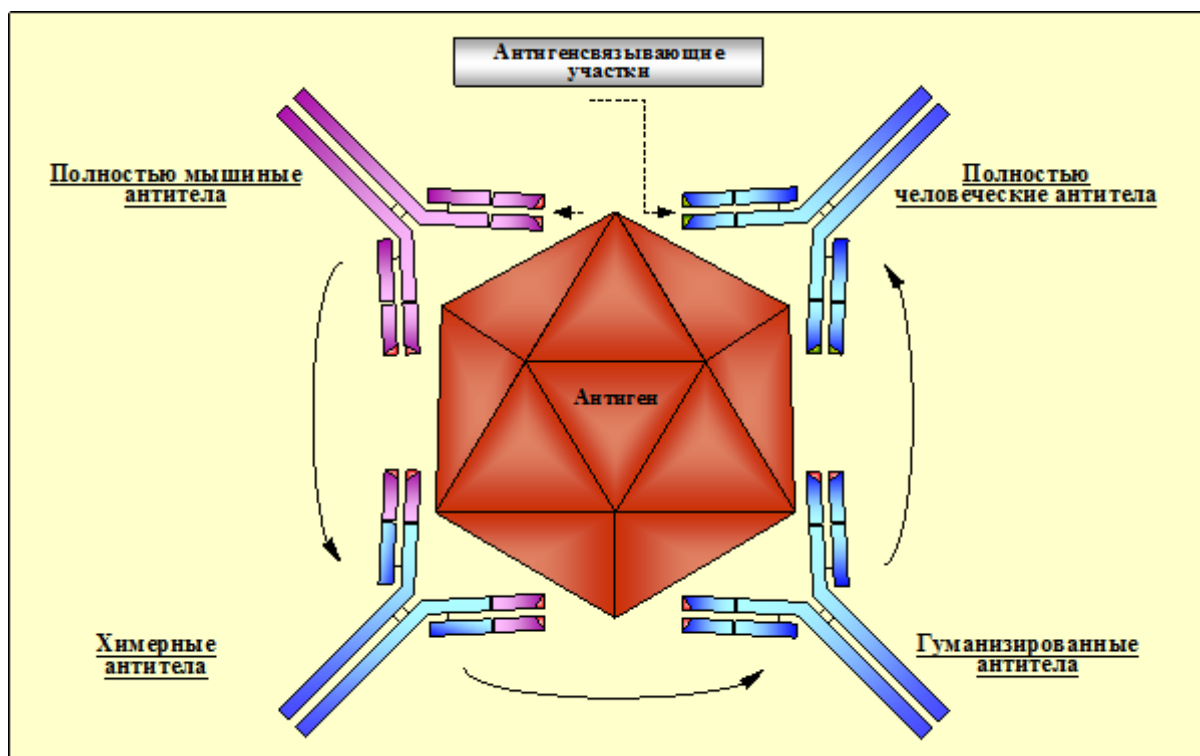


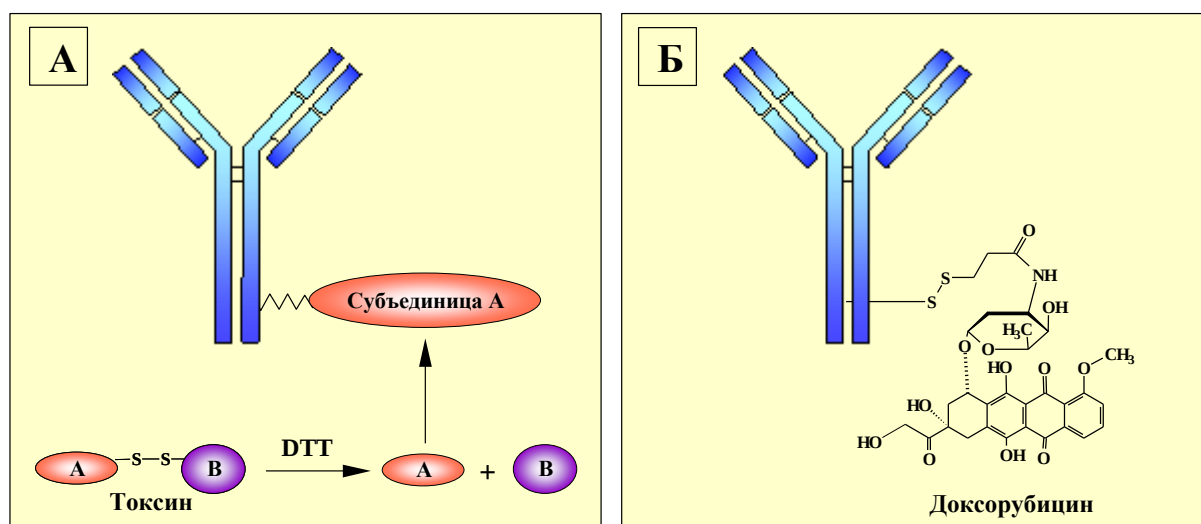
Рис. 63. Гуманизация антител (IgG). Мышинные антитела легко доступны, однако обладают высокой иммуногенностью. Для снижения иммуногенности мышиных антител первоначально с помощью генно-инженерных методов были получены химерные антитела (мышь-человек), в которых лишь варибельные участки происходят от мыши, а около 70% аминокислотной последовательности – от человека. Затем были получены рекомбинантные гуманизированные антитела, в структуре которых более 90% аминокислотной последовательности происходит от человека, и лишь небольшие участки антигенсвязывающих последовательностей – от мыши. Наконец были получены полностью человеческие антитела (IgG), которые продуцировались трансгенными мышами после их иммунизации опухолевыми антигенами. Таким образом удалось добиться резкого снижения иммуногенности антител. Химерные, гуманизированные и человеческие антитела широко применяются в области онкологии как в свободном состоянии, так и в виде конъюгатов с противоопухолевыми агентами.

направленного действия позволило бы вызвать эффективную интернализацию, до сих пор является трудноразрешимой задачей. В связи с этим в качестве мишеней для препаратов направленного действия обычно выбирают антигены, плотность которых на поверхности опухолевых клеток значительно выше, чем на нормальных. Таким образом достигается избирательность действия иммуноконъюгатов.

Антитела как молекулярные векторы

При синтезе цитотоксических препаратов направленного действия в качестве векторных компонентов используют не только полноразмерные молекулы антител, но и их антигенсвязывающие фрагменты [127]. Хотя существует ряд стратегий получения конъюгатов моноклональных антител с цитотоксическими соединениями, независимо от

выбранной стратегии следует руководствоваться следующими правилами: присоединение химиопрепарата к моноклональному антителу должно производиться без изменения иммунореактивности последнего; кросс-линкер, используемый при создании иммуноконъюгата, должен эффективно связывать конъюгируемые молекулы, обеспечивать сохранение терапевтических свойств химиопрепарата и возможность его отщепления после достижения клетки-мишени; желательно, чтобы кросс-линкер обеспечивал возможность ковалентного присоединения препарата как к интактному антителу, так и его фрагменту; конъюгат должен обладать минимальной иммуногенностью; технология получения конъюгата должна быть достаточно экономичной и пригодной для организации промышленного производства. Привлекательность моноклональных антител для использования в качестве векторных молекул обусловлена не только возможностью распознавания специфических антигенов, но и наличием большого числа сайтов, по которым можно осуществить присоединение токсинов и химиопрепаратов. Для получения иммуноконъюгатов важно знать участки аминокислотной последовательности, в которых локализованы реакционноспособные сайты, и в структуре антител имеется довольно много таких участков (рис. 62). Наиболее широко при конъюгировании антител используется ε-



аминогруппа остатков лизина. С химической точки зрения эта группа может легко образовывать амидную связь с карбоксильной группой в реакции, опосредуемой карбодиимидами. Кроме того, ε-аминогруппу часто используют в реакциях с активными группами гетеробифункциональных реагентов, подобных SPDP, при необходимости введения в полипептидную цепь тиольных групп. Как видно на рис. 62, достаточно большое число остатков лизина, которые могут быть использованы для получения конъюгатов, содержится в различных участках последовательности молекулы антитела [90, 278].

Модификация моноклональных антител также может производиться по остаткам полисахаридов, присоединенных к шарнирной области молекулы (рис. 62). Для этого проводят периодатное окисление полисахаридов с образованием альдегидных групп, которые можно затем использовать в различных методиках конъюгирования [317]. Альдегидные группы можно также ввести в иммуноглобулины путем проведения ферментативных реакций с участием нейраминидазы и глюкозооксидазы.

Помимо ε-аминогрупп лизина и полисахаридов, для присоединения терапевтических агентов можно использовать внутримолекулярные дисульфидные связи, стабилизирующие структуру антител. Путем подбора условий реакции внутрицепочечные связи, стабилизирующие доменную структуру антитела, можно избирательно расщепить с помощью дитиотреитола или β-меркаптоэтанола, не затрагивая при этом межцепочечных связей, которые удерживают отдельные цепи антитела вместе. Использование данного подхода позволяет получать с довольно высоким выходом активные водорастворимые конъюгаты, содержащие фиксированное число молекул присоединенного терапевтического агента. Также описан «сшивающий» агент, представляющий собой гидразон с разветвленной цепью, который позволяет более эффективно использовать соответствующий участок присоединения за счет удвоения числа химически связанных с антителом молекул терапевтического агента [157]. При получении противоопухолевых конъюгатов на основе антител обычно используют уже применяемые в клинической практике противоопухолевые химиопрепараты, такие как винкристин, винбластин, доксорубицин, даунорубицин, карминомицин и др., которые присоединяются к антителам с помощью стабильных, например амидных, или легко расщепляемых в клетке, например дисульфидных, связей [127].

Важным требованием, которому должен удовлетворять молекулярный линкер, осуществляющий связь между компонентами конъюгата, является способность к сохранению стабильности в кровотоке в течение длительного времени. При этом линкер должен легко и специфично расщепляться в клетке после интернализации конъюгата. Этому требованию отвечают деградируемые пептидные линкеры [76], а также линкеры, имеющие в своей цепочке дисульфидную связь или связанные с токсическим компонентом конъюгата посредством других достаточно лабильных связей [122, 364].

Основные мишени действия иммуноконъюгатов

Для успешного терапевтического применения иммуноконъюгатов необходимо правильно выбрать антиген, локализованный на поверхности опухолевой клетки. В идеальном случае антиген должен отвечать нескольким требованиям, а именно: либо экспрессироваться исключительно раковыми клетками, либо присутствовать в значительно большем количестве на поверхности опухолевых клеток по сравнению с нормальными; постоянно презентироваться на поверхности клеток опухоли; экспрессироваться всеми клетками опухолевой популяции; экспрессироваться различными видами опухолей; после связывания с векторной молекулой обеспечивать эффективную интернализацию препаратов направленного действия и т.д.

Большинство уже испытанных антител непосредственно нацелено против антигенов поверхности опухолевых клеток. Чаще всего эти антигены представляют собой трансмембранные рецепторы, опосредующие процессы передачи гормональных сигналов, необходимых для осуществления регуляции клеточной активности и поддержания злокачественного фенотипа опухолевых клеток [394]. В последние годы также широко применяются антитела против антигенов, локализованных на поверхности эндотелиоцитов опухолевых кровеносных сосудов. Такие антитела или полученные на их основе препараты направленного действия способны вызывать деструкцию опухолевой кровеносной сети и эффективно подавлять рост опухоли. Стратегия, направленная на поражение опухолевых кровеносных сосудов, имеет ряд преимуществ перед традиционными подходами, основанными на непосредственном воздействии на опухоль с помощью цитотоксических препаратов. К таким преимуществам относятся генетическая стабильность и однородность популяции эндотелиальных клеток, стабильность экспрессии антигенов на поверхности опухолевого эндотелия, отсутствие эффекта «сброса» антигенов и т.д. Вследствие этого препараты, избирательно действующие на опухолевые кровеносные сосуды, могут применяться для подавления развития опухолей различных типов. Также эти препараты отличаются низкой токсичностью по отношению к другим тканям, и вероятность быстрого развития лекарственной резистентности к ним у эндотелиальных клеток очень мала.

Чаще всего при воздействии на опухолевые кровеносные сосуды применяют антитела против фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF) и рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [8, 130]. Получены также антитела к молекулам адгезии эндотелиальных клеток – интегринам ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$), кадгерину сосудистого эндотелия и молекуле адгезии PECAM, экспрессированной на поверхности эндотелиальных клеток и тромбоцитов [252]. Опухолевые клетки способны рассеиваться по организму двумя путями – по кровеносным сосудам и через лимфатическую систему. Поскольку VEGF играет ключевую роль в регуляции опухолевого ангиогенеза и лимфоангиогенеза, направленное воздействие на сигнальную систему VEGF может служить эффективным инструментом блокирования гематогенного и лимфогенного метастазирования [250]. Интенсивность прогрессии опухоли также во многом определяется действием ряда

цитокинов и хемокинов, составляющих еще одну группу потенциальных мишеней для воздействия с помощью антител. Поскольку фактор некроза опухолей $\text{TNF-}\alpha$ играет важную роль в развитии опухолевого процесса, он также может рассматриваться в качестве объекта воздействия при разработке стратегий терапии с использованием антител [341].

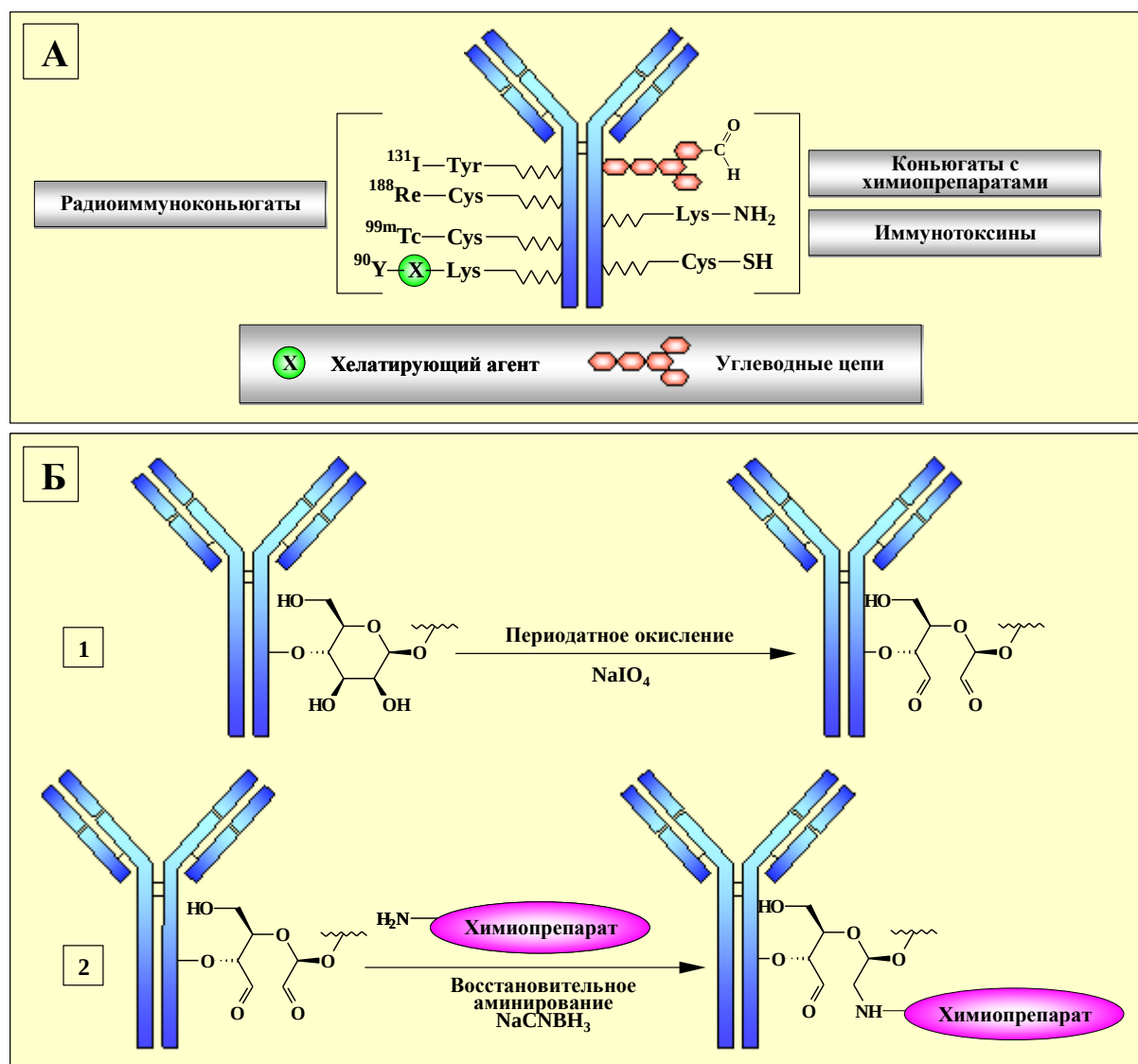


Рис. 65. Различные подходы к получению химических конъюгатов антител с радиоизотопами, химиопрепаратами и токсинами. **А.** Радиоиммуноконъюгаты могут быть получены путем связывания радиоактивных изотопов с остатками тирозина (изотопы иода) и цистеина (изотопы рения и технеция). Конъюгаты таких радиоактивных изотопов, как иттрий ^{90}Y , могут быть получены путем связывания с хелатирующими агентами, которые, в свою очередь, связаны с остатками лизина. Конъюгаты химиопрепаратов и белковых токсинов с антителами могут быть получены путем их взаимодействия с аминогруппами остатков лизина и тиольными группами – цистеина. После соответствующей модификации углеводные цепи антител могут быть также использованы для получения конъюгатов с химиопрепаратами и белковыми токсинами. **Б.** Схема реакции получения конъюгатов антител с химиопрепаратами, в которой задействуются углеводные цепи. После периодатного окисления углеводных цепей антител (1) производят реакцию их конъюгирования с химиопрепаратами (2).

Иммунотоксины

Для исследования возможностей терапевтического применения препаратов направленного действия в области онкологии чаще всего получают конъюгаты антител с токсинами, химиопрепаратами, хелатирующими агентами, несущими радионуклиды и др. (рис. 65). Результаты многочисленных лабораторных исследований свидетельствуют о

Таблица 2. Конъюгаты моноклональных антител и их фрагментов с токсинами и противоопухолевыми антибиотиками, находящиеся в стадии клинических испытаний

Название	Природа антител	Активное вещество	Область применения	Ссылка
ИММУНОТОКСИНЫ				
Химические конъюгаты антитело–токсин				
Anti-CD7-dgA	Антитела к CD7	Дегликозилированная А-субъединица рицина (растительного токсина)	Т-клеточная неходжкинская лимфома	[98]
HD37-dgA	Антитела к CD19	— // —	В-клеточная неходжкинская лимфома	[318]
RFB4-dgA	Антитела к CD22	— // —	В-клеточная неходжкинская лимфома, хроническая лимфоцитарная лейкемия	[7, 285]
RFB4-Fab'-dgA	Fab'-фрагменты антител к CD22	— // —	В-клеточная неходжкинская лимфома	[363]
RFT5-dgA	Антитела к CD25	— // —	Болезнь Ходжкина	[83, 291]
Ki-4.dgA	Антитела к CD30	— // —	Болезнь Ходжкина	[290]
Anti-B4-bRicin	Антитела к CD19	Рицин с химически блокированными сайтами связывания с галактозой на В-субъединице токсина	В-клеточная неходжкинская лимфома	[120, 217, 225]
Anti-My9-bRicin	Антитела к CD33	— // —	Острая миелоидная лейкемия	[225]
N901-bR	Антитела к опухолевому антигену Lewis Y (Le ^Y)	— // —	Мелкоклеточный рак легкого	[84, 193, 225]
454A12-rRA	Антитела к рецептору трансферрина	Рекомбинантная А-субъединица рицина	Метастазы в спинном мозге	[180, 181]
B43-PAP	Антитела к CD19	PAP (противовирусный белок из фитолакки американской)	Острая лимфоцитарная лейкемия	[349]
Ber-H2-Sap6	Антитела к CD30	Сапорин (растительный токсин)	Болезнь Ходжкина	[370]
LMB-1	Антитела к Le ^Y	Lys-PE38 (укороченный псевдомонадный экзотоксин PE, в котором отсутствует домен, обеспечивающий связывание с клеткой)	Карцинома	[235]

высоком терапевтическом потенциале препаратов направленного действия, среди которых особый интерес вызывают иммунотоксины, или конъюгаты антител с токсинами. Иммунотоксины получают с помощью описанных выше методик путем присоединения к

Таблица 2 (продолжение). Конъюгаты моноклональных антител и их фрагментов с токсинами и противоопухолевыми антибиотиками, находящиеся в стадии клинических испытаний

Название	Природа антител	Активное вещество	Область применения	Ссылка
ИММУНОТОКСИНЫ				
Рекомбинантные иммунотоксины				
BL22	dsFv-фрагменты антител к CD22	Фрагмент псевдомонадного экзотоксина PE38	Волосатоклеточная лейкемия, хроническая лимфоцитарная лейкемия, неходжкинская лимфома	[167]
LMB-2	scFv-фрагменты антител к CD25	— // —	Неходжкинская лимфома, лейкемии	[168, 169]
erb38	dsFv-фрагменты антител к erbB2	— // —	Рак молочной железы	[237]
SS1(dsFv)-PE38	dsFv-фрагменты антител к мезотелину (белку поверхности опухолевых клеток)	— // —	Плевральная, перитонеальная, паховая (ингвинальная) мезотелиомы, рак яичника, рак поджелудочной железы	[53]
HA22-8X	Fv-фрагменты антител к CD22	Мутантный фрагмент псевдомонадного экзотоксина PE38	Волосатоклеточная лейкемия (резистентные формы)	[228]
BR96(scFv)-PE40	scFv-фрагменты антител к опухолевому антигену Lewis Y (Le ^Y)	Фрагмент псевдомонадного экзотоксина PE40	Карцинома	[62, 121, 251]
B3(Fv)-PE38	Fv-фрагменты антител к Le ^Y	Фрагмент дифтерийного токсина DT388	Карцинома	[236]
B3(dsFv)-PE38	scFv-фрагменты антител к Le ^Y	— // —	Карцинома	[15]
КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛ С АНТИБИОТИКАМИ				
SGN-15 (cBR96-doxorubicin)	Антитела к Le ^Y	Доксорубин	Немелкоклеточный рак легкого, рак прямой кишки	[273]
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®) (разрешен в 2000 г.)	Гуманизированные антитела к CD33	Калихемицин	Острая миелоидная лейкемия	[49]

антителам растительных (сапонин, рицин А и др.) или бактериальных токсинов (дифтерийный токсин, псевдомонадный экзотоксин, или экзотоксин синегнойной палочки, и др.) (табл. 2). В некоторых случаях с помощью генно-инженерных технологий получают конъюгаты моноклональных антител или векторных белков с токсинами в виде рекомбинантных химерных белков («фьюжн-белков») (табл. 2).

В настоящее время в составе иммуноконъюгатов широко используют растительные холо- и гемитоксины. К холотоксинам, или инактивирующим рибосомы белкам класса II, относятся: лектины (гликопротеины) из клещевины (рицин), абруса (абрин), омелы белой,

пассифлоры (модецин). Гемитоксины, или инактивирующие рибосомы белки класса I, включают: антивирусный белок из фитолакки американской (англ. сокращение PAP), сапорин из мыльнянки лекарственной, бридин 1 из переступня белого, бугенин из бугенвиллии пурпурной, гелонин из хамелириума желтого. Растительные холотоксины состоят из двух субъединиц – связывающей и каталитической. Гемитоксины содержат лишь каталитическую субъединицу. При попадании в клетку растительные токсины препятствуют ассоциации факторов элонгации EF-1 и EF-2 с 60S-субъединицей рибосомы путем выщепления остатка аденина A⁴³²⁴ из 28S рРНК 60S-субъединицы; рицин также выщепляет соседний с A⁴³²⁴ остаток – гуанин G⁴³²³. Действие растительных токсинов вызывает апоптотическую гибель клеток. Субъединицы холотоксинов связаны между собой посредством дисульфидных мостиков. При попадании токсинов во внеклеточное пространство связывающая субъединица холотоксина посредством сложного механизма взаимодействует с поверхностью плазматической мембраны, затем с внутриклеточными мембранами, после чего токсин погружается в клетку, дисульфидная связь расщепляется, и каталитическая субъединица в результате компартиментализации попадает в эндоплазматический ретикулум. В отличие от холотоксинов, каталитическая субъединица гемитоксинов способна самостоятельно связываться с поверхностью плазматической мембраны и проникать в клетку. Поскольку построенные из субъединиц растительные и бактериальные токсины имеют собственный векторный компонент, предназначенный для связывания с клетками хозяина, перед получением конъюгата этот компонент должен быть удален из состава токсина. После этого производят конъюгирование оставшегося токсического компонента с векторным белком, призванным осуществить адресную доставку конъюгата к ткани-мишени, клетки которой несут соответствующие вектору рецепторы.

Как указывалось выше, токсины белковой природы могут быть получены с помощью генно-инженерных методов в виде химерных белков, в состав которых наряду с токсическим компонентом могут входить белковые векторы (антитела, цитокины или их пептидные фрагменты). К существенным недостаткам подобных конструкций относится высокая иммуногенность, поскольку токсический компонент представляет собой чужеродный для организма человека белок. Помимо токсинов, продуцируемых растениями, бактериями и грибами, для получения конъюгатов также используют рибонуклеазы (РНКазы), выделяемые из тканей позвоночных.

Одной из перспективных генно-инженерных конструкций противоопухолевого иммунотоксина является химерный белок, в состав которого входит аминокислотная последовательность антитела против антигена CD22, «слитая» с последовательностью экзотоксина A, продуцируемого бактериями рода *Pseudomonas*. Клинические исследования показали терапевтическую активность препарата в отношении волосатоклеточной лейкемии [168, 169, 228]. Также генно-инженерными методами был получен рекомбинантный иммунотоксин, включающий фрагмент антитела scFv к опухолевому антигену Lewis Y (Le^Y) и экзотоксин из *Pseudomonas* [62, 121, 251]. В клинических испытаниях препарат иммунотоксина продемонстрировал низкую терапевтическую активность из-за высокой

токсичности в отношении клеток желудочно-кишечного тракта, обусловленной кросс-реактивностью фрагмента scFv по отношению не только к опухолевым клеткам, но и нормальным клеткам эпителия желудочно-кишечного тракта. Очевидно, что применение антител, более специфичных к опухолевым антигенам, может позволить добиться повышения противоопухолевой активности данного иммунотоксина.

В качестве примера противоопухолевых иммунотоксинов, компоненты которых связаны химически, можно привести конъюгаты антител против антигенов CD19 и CD22 с А-цепью рицина [7, 285, 318, 363]. Ригин достаточно хорошо изучен и имеет интересную историю, поэтому стоит остановиться на нем подробнее. Очищенный ригин имеет вид белого порошка, без запаха, хорошо растворим в воде и сильно токсичен.

Известны случаи применения рицина в качестве сильнодействующего яда. Считается, что в 1978 г с помощью рицина в Лондоне агентами болгарских спецслужб был ликвидирован болгарский диссидент Георгий Марков [276]. Яд был введен Маркову, проходящим мимо агентом посредством «укола зонтиком», на который поначалу диссидент даже не обратил внимания. Хитроумное устройство для введения рицина под кожу было вмонтировано в наконечник зонтика в виде микрошприца, несущего маленький шарик из платинового сплава с ригином. Поскольку токсическое действие яда имело отложенные последствия, Г. Марков скончался через два дня после инцидента, приняв мучительную смерть.

Как уже отмечалось, ригин представляет собой холотоксин (гликопротеин с мол. массой 62 056 Да), состоящий из двух гликозилированных субъединиц (А и В), связанных дисульфидной связью. На долю полисахаридов приходится около 20% молекулярной массы рицина. Каталитическая субъединица А (мол. масса 30 625 Да) проявляет высокоспецифичную эндонуклеазную активность и осуществляет в цитоплазме модификацию 28S-РНК 60S-субъединиц рибосом. Функция субъединицы В сводится к доставке токсина в клетку. Поскольку в иммуноконъюгатах на основе рицина в качестве векторного компонента, осуществляющего доставку субъединицы А в опухолевые клетки, используются антитела, субъединицу В, позволяющую токсину проникать в нормальные клетки, перед конъюгированием отделяют и удаляют. Таким образом, при создании конъюгатов рицина используют только каталитическую субъединицу А. Дополнительно для устранения возможности взаимодействия углеводных компонентов субъединицы А с нормальными тканями производят либо ее дегликозилирование, либо экспрессию в виде дегликозилированного рекомбинантного белка в штаммах *E. coli*, в которых система гликозилирования белков отсутствует. Субъединица В (мол. масса 31 431 Да) представляет собой лектин, имеющий два центра связывания галактозы. На поверхности клетки субъединица В связывается с галактозилированными рецепторами, и ригин попадает в клетку путем рецепторопосредованного эндоцитоза. Существует также точка зрения, что связывание субъединицы В с рецептором вызывает локальную структурную перестройку мембраны, в результате которой образуется трансмембранный канал, через который ригин и попадает в клетку. Так или иначе, но в отдельности субъединицы рицина в отличие от целого

холотоксина не проявляют токсического действия, поскольку каталитическая субъединица сама по себе не способна проникать в клетку. После интернализации токсин из эндосомного компартмента попадает в аппарат Гольджи и затем в эндоплазматический ретикулум, где посредством выщепления остатков аденина и гуанина из 28S-РНК 60S-субъединицы рибосомы вызывает нарушение связывания факторов элонгации EF-1 и EF-2 с 60S-субъединицей, приводящее к блокированию биосинтеза белка и апоптотической гибели клетки. Принято считать, что диссоциация холотоксина рицина на отдельные субъединицы происходит в эндоплазматическом ретикулуме в результате восстановления межмолекулярной дисульфидной связи.

Поскольку рицин проявляет высокую токсичность, получение иммуноконъюгатов на его основе с применением высокоспецифичных антител к опухолевым антигенам является актуальной задачей. К сожалению, терапевтическая эффективность конъюгата дегликозилированной субъединицы А рицина с антителами против CD22, применяемого для

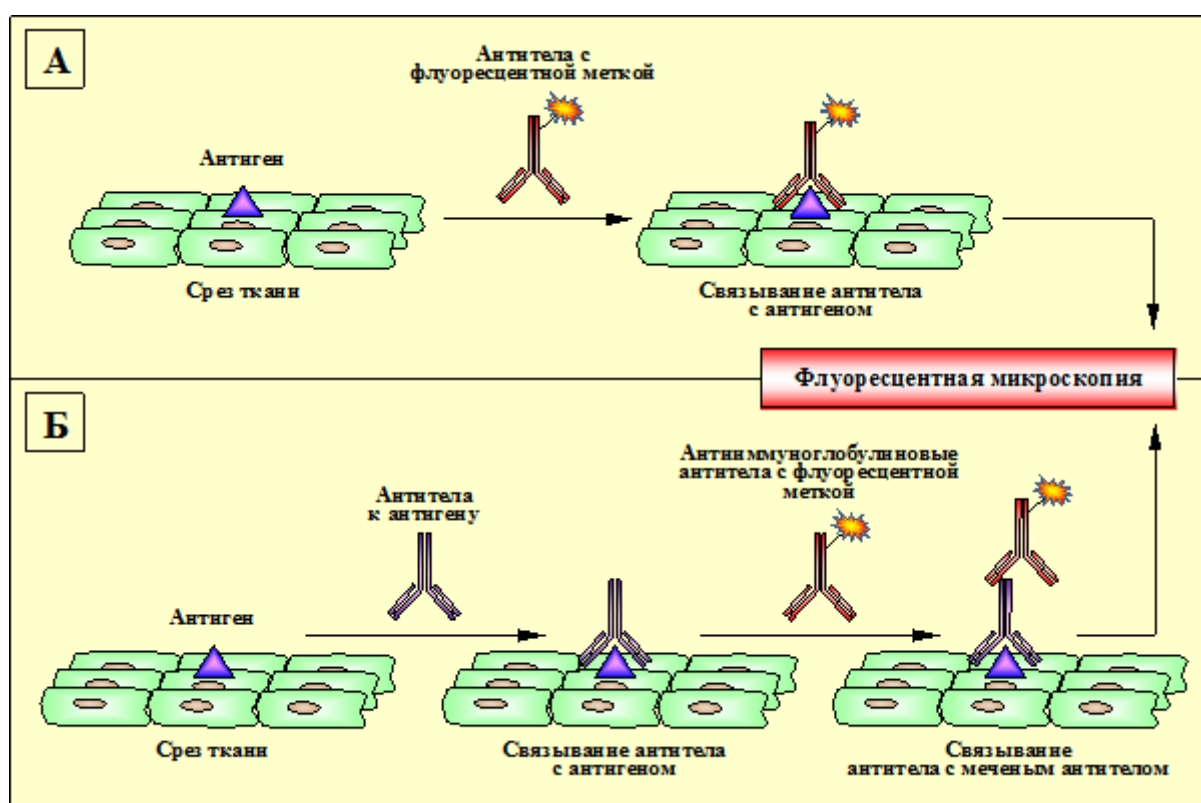


Рис. 66. Применение иммунофлуоресцентных методов для выявления антигенов in situ. А. При прямом методе выявления антитела, меченные флуоресцентным красителем, непосредственно связываются с соответствующими антигенами, локализованными на поверхности ткани. Б. При непрямом методе сначала ткань обрабатывают немечеными антигенспецифичными антителами. Эти антитела затем связываются с антииммуноглобулиновыми антителами, меченными флуоресцентным красителем. В обоих случаях связавшиеся антитела выявляют с помощью флуоресцентного микроскопа. В окуляре на фоне темного поля видны светящиеся участки, в которых локализованы меченые антитела. Каждый тканевой антиген имеет характерное распределение на поверхности ткани.

терапии В-клеточной лимфомы, оказалась не слишком высокой вследствие значительной неспецифической токсичности, обусловленной связыванием антител с эндотелиоцитами и быстро развивающимся синдромом текучести сосудов. Очевидно, что в данном случае повышение избирательности действия препарата в отношении опухолевой ткани за счет введения в его состав более специфичных антител к опухолевым антигенам может резко увеличить терапевтическую эффективность.

Приведенный пример иммунотоксина, полученного на основе рицина, иллюстрирует трудности, возникающие на пути терапевтического применения создаваемых в лабораториях конструкций, несмотря на которые продолжается активная разработка и изучение подобных препаратов, в состав которых входят фрагменты как растительных, так и бактериальных токсинов (табл. 2). Несомненно, что применение в онкологии растительных и бактериальных токсинов не только в составе иммунотоксинов, но и конъюгатов с векторными белками и пептидами имеет большое будущее.

Радиоиммуноконъюгаты

Наиболее широкое применение антитела и биоконъюгаты находят в областях онкологии, молекулярной медицины, иммунологии, иммунохимии, молекулярной биологии и др. В силу доступности, относительно низкой стоимости и уникальных свойств антитела в свободном состоянии или в составе биоконъюгатов, как и в предшествующие десятилетия, активно применяют для иммунологических анализов, разработки различных тест-систем, очистки белков с помощью аффинной хроматографии, создания новых терапевтических препаратов направленного действия, терапии онкологических заболеваний и т.п. В различных диагностических и тестовых системах особенно широко применяют меченые антитела, например, флуоресцентно меченые антитела используют для определения антигенов *in situ*, с помощью прямых или непрямых иммунофлуоресцентных методов (рис. 66). Для этого предварительно на криостате готовят срезы из образцов замороженной ткани. При прямом методе раствор меченных флуоресцентным красителем антител наносят на поверхность ткани, инкубируют и отмывают от несвязавшихся антител (рис. 66 А). Участки локализации антигена выявляют с помощью флуоресцентного микроскопа. При непрямом методе на срез ткани сначала наносят раствор немеченых антител к искомому антигену, а затем для выявления антител, связавшихся с антигеном, после отмывания добавляют раствор меченных флуорохромом антииммуноглобулиновых антител (рис. 66 Б). Кроме флуоресцентных меток, в биомедицинских исследованиях для мечения антител и других белков применяют радиоактивные изотопы.

Общие сведения о строении атома и химических элементах

Как известно, химические свойства атома определяются числом электронов, находящихся на атомных орбиталях. Масса электрона ничтожно мала (почти в 2 000 раз меньше массы атома водорода), и ею обычно пренебрегают.

За исключением ядра изотопа водорода – протия (${}^1_1\text{H}$), которое представляет собой протон, ядра остальных атомов состоят из протонов и нейтронов, между которыми существует притяжение, обеспечивающее стабильность ядер, несмотря на эффекты отталкивания между положительно заряженными протонами. Протон обладает массой 1,00728 а.е.м. (атомная единица массы) и зарядом +1. За единицу электрического заряда принимается заряд электрона; заряд протона по абсолютной величине равен заряду электрона. Масса нейтрона равна 1,00866 а.е.м., заряд равен 0.

Массы атомов и молекул измеряются в относительных единицах – атомных единицах массы. Атомная единица массы (а.е.м.) определяется как 1/12 часть массы атома углерода ${}^{12}_6\text{C}$ и приблизительно равна $1,66057 \cdot 10^{-24}$ г. Атомную единицу массы называют также дальтоном (Да) в честь одного из основоположников атомной теории Дж. Дальтона, который принял массу атома водорода за единицу и на основании этого разработал таблицу атомных масс.

Относительной атомной массой, или атомной массой элемента, называют массу его атома, выраженную в атомных единицах массы. Относительная молекулярная масса, или молекулярная масса вещества – масса его молекулы, выраженная в атомных единицах массы.

Сумма числа протонов и нейтронов, составляющих ядро атома, называется массовым числом атома. Масса атома определяется числом входящих в его состав протонов и нейтронов и измеряется в относительных атомных единицах массы. Например, относительная атомная масса гелия равна 4 а.е.м., атомная масса углерода – 12 а.е.м., кислорода – 16 а.е.м. Но массы протона (1,00728 а.е.м.) и нейтрона (1,00866 а.е.м.) приблизительно равны между собой и приблизительно равны 1 а.е.м., поэтому относительная масса атома, выражаемая числом а.е.м., приблизительно равна числу входящих в состав атома протонов и нейтронов (массовому числу атома).

Масса протона (1,00728 а.е.м.) близка к массе атома наилегчайшего изотопа водорода – протия ${}^1_1\text{H}$ (1,00783 а.е.м.), который представляет собой атом с наименьшей массой, содержащий лишь один протон и один электрон.

Химический элемент представляет собой определенный вид атомов, который определяется атомным порядковым номером в периодической системе (т.е. характеризуется определенной величиной положительного заряда ядра) и может состоять как из одинаковых, так и различающихся по массе атомов (изотопов). Из этого определения следует, что химический элемент представляет собой совокупность изотопов, атомы которых обладают одинаковым зарядом ядра и тождественными химическими свойствами, но отличаются числом нейтронов. В настоящее время известно 114 элементов. Простые вещества включают атомы лишь одного элемента, тогда как сложные вещества (химические соединения, например, H_2O , Al_2O_3 , NaCl и др.) включают атомы нескольких элементов.

Изотопы элементов подразделяются на стабильные и радиоактивные. Поскольку стабильные изотопы (например, ${}^{12}_6\text{C}$, ${}^{14}_7\text{N}$, ${}^{16}_8\text{O}$, ${}^{32}_{16}\text{S}$) не подвергаются радиоактивному распаду, они сохраняются в природных условиях. Самым тяжелым из стабильных изотопов

является свинец $^{208}_{82}\text{Pb}$ с массой 207,97665. Радиоактивные изотопы (естественные или искусственные) самопроизвольно распадаются с образованием стабильных изотопов, испуская при этом α или β -частицы. Например, стабильные изотопы свинца $^{206}_{82}\text{Pb}$, $^{207}_{82}\text{Pb}$ и $^{208}_{82}\text{Pb}$ являются конечными продуктами радиоактивного распада урана, актиния и тория.

В периодической системе химических элементов отражены относительные атомные массы элементов, которые представляют собой безразмерные величины, равные отношению средней массы атома элемента к 1/12 массы атома углерода $^{12}_6\text{C}$ (рис. 67). Относительная атомная масса элемента – масса атома элемента, выраженная в атомных единицах массы. При расчете относительной атомной массы (A_r) учитывается изотопный состав элемента и распространенность изотопов на Земле. В качестве примера можно привести химический элемент водород с порядковым атомным номером 1 и атомной массой 1,00794. Существует три изотопа водорода – протий ^1_1H , дейтерий ^2_1D и тритий ^3_1T (радиоактивный изотоп, период полураспада которого составляет 12,26 лет). Для обозначения изотопов водорода используются специальные символы и названия; изотопы других элементов обычно не имеют специальных названий. Природный водород преимущественно состоит из смеси двух стабильных изотопов – протия с атомной массой 1,00783 (в смеси содержится 99,985% изотопа) и дейтерия с атомной массой 2,01355 (0,015%). В природе радиоактивный изотоп тритий присутствует в ничтожных количествах. Относительная атомная масса элемента водорода вычисляется по формуле:

$$A_r = \frac{0,99985 \cdot m(^1_1\text{H}) + 0,00015 \cdot m(^2_1\text{D})}{1/12 \cdot m(^{12}_6\text{C})} = 1,00794.$$

Средняя абсолютная масса атома элемента равна относительной атомной массе, умноженной на а.е.м.:

$$m(\text{H}) = 1,00794 \cdot 1,66057 \cdot 10^{-24} \text{ г} = 1,67375 \cdot 10^{-24} \text{ г}.$$

В периодической системе элементов отражены именно величины A_r , которые представляют собой усредненные значения масс атомов изотопов, входящих в состав элемента. Например, как и в случае водорода, представленная в периодической системе относительная атомная масса элемента свинца $^{207,19}_{82}\text{Pb}$ $A_r = 207,19$ является усредненной из масс нескольких изотопов: $^{204}_{82}\text{Pb}$ (1,4%), $^{206}_{82}\text{Pb}$ (24,1%), $^{207}_{82}\text{Pb}$ (22,1%) и $^{208}_{82}\text{Pb}$ (52,4%).

Как уже отмечалось, массовое число атома (т.е. сумма числа протонов и нейтронов, составляющих ядро атома) приблизительно равно его атомной массе. Например, относительная атомная масса углерода равна 12,011, и это означает, что сумма протонов и нейтронов, составляющих его ядро (массовое число), также равна 12. Число протонов равно числу положительных зарядов, отраженному в порядковом номере элемента, и таким образом число нейтронов равно разности между массовым числом и порядковым номером элемента. Например, в случае кислорода массовое число равно 16, а порядковый номер элемента – 8, следовательно, число нейтронов составляет $16 - 8 = 8$. Существуют закономерности, отражающие устойчивость сочетания протонов с нейтронами. В случаях,

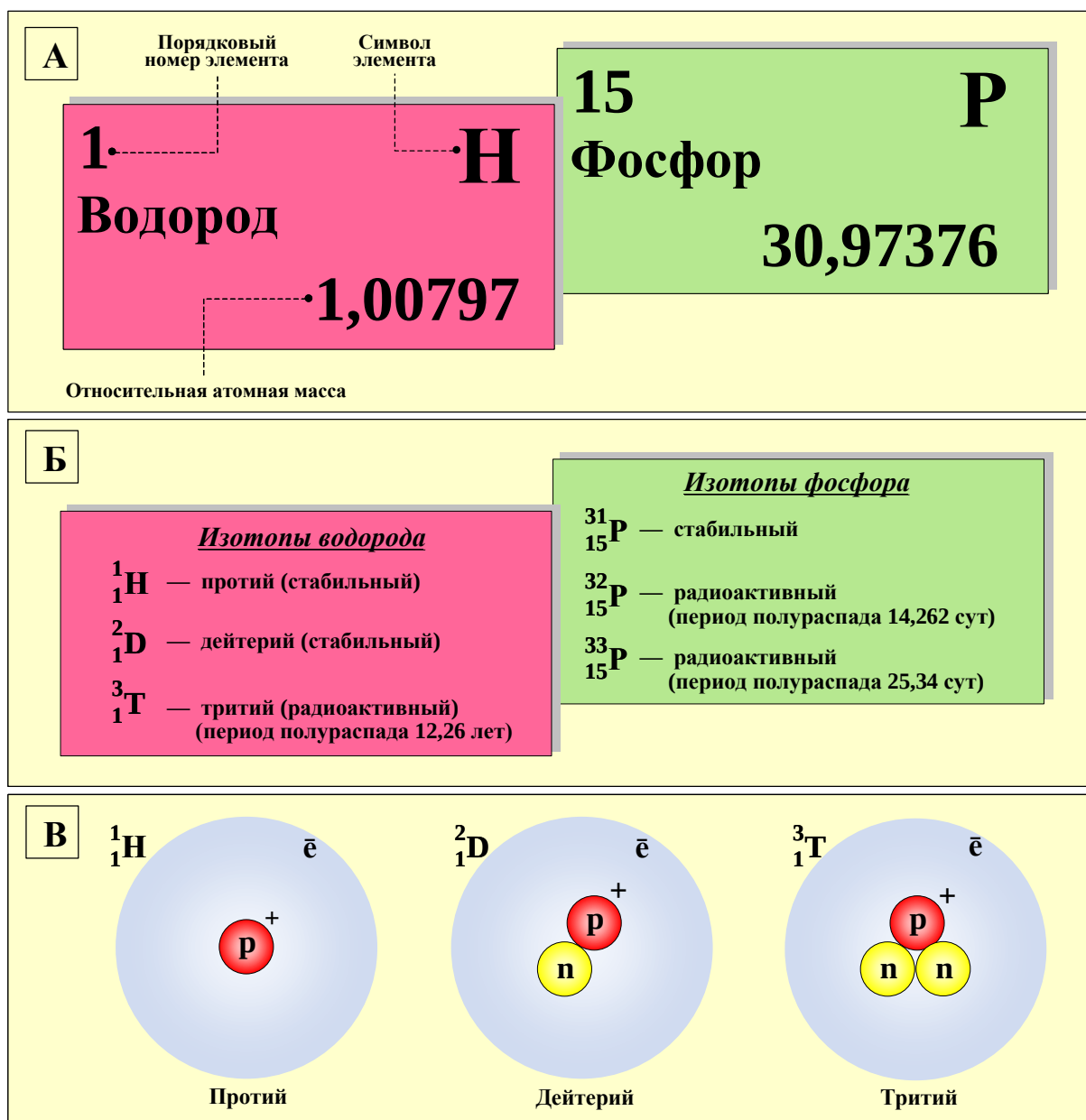


Рис. 67. Атомы и изотопы. А. Значение некоторых символов и обозначений, принятых в периодической таблице элементов Д.И. Менделеева. При расчете относительной атомной массы элемента учитывается изотопный состав и распространенность изотопов на Земле. Относительная атомная масса элемента, или атомная масса элемента – масса атома элемента, выраженная в атомных единицах массы (углеродных единицах). Атомная единица массы (а.е.м.) равна $1,66057 \times 10^{-24}$ г и представляет собой 1/12 часть массы атома изотопа углерода ${}^{12}\text{C}$. Относительная масса атома приблизительно равна массовому числу (сумме числа протонов и нейтронов, входящих в состав ядра атома). Порядковый номер отражает число протонов, равное числу положительных зарядов. Среднее число нейтронов равно разности между массовым числом и порядковым номером элемента (для атома фосфора $31-15=16$ нейтронов). Б. Изотопы водорода и фосфора. Относительную атомную массу изотопа обозначают сверху слева от символа элемента, порядковый номер – снизу слева. В. Строение атомов изотопов водорода.

характерных для легких элементов, когда число протонов приблизительно равно числу нейтронов, атомы наиболее устойчивы. Например, в случае углерода $^{12}_6\text{C}$ число протонов – 6, число нейтронов – тоже 6; в случае фосфора $^{31}_{15}\text{P}$ число протонов равно 15, число нейтронов – 16. По мере увеличения заряда ядра относительное число нейтронов, необходимых для стабилизации ядра, постоянно возрастает, и у элементов последних рядов периодической системы число нейтронов уже значительно превышает число протонов. Например, в случае иода $^{127}_{53}\text{I}$ число протонов – 53, число нейтронов заметно больше – 74; в случае висмута $^{209}_{83}\text{Bi}$ число протонов – 83, число нейтронов 126. Ядра более тяжелых элементов отличаются неустойчивостью. Следует учитывать, что масса ядра всегда несколько ниже суммы масс входящих в его состав протонов и нейтронов (эффект дефекта массы). Дефект массы обусловлен значительным выделением энергии, происходящем при образовании атомных ядер.

Изотопы для биомедицинских исследований

Все атомы одного и того же элемента содержат одинаковое число протонов, а количество нейтронов может быть различным. Изотопами называются атомы, имеющие одинаковое число протонов, но разное число нейтронов, а, следовательно, и разное массовое число. Каждый элемент представляет собой совокупность изотопов. Изотопы обозначают обычными символами элементов, указывая слева сверху индекс, обозначающий массовое число изотопа, а слева внизу (если это необходимо) порядковый номер (заряд ядра, или число протонов) (рис. 67). Например, стабильные изотопы водорода ^1_1H (протий), ^2_1D (дейтерий) и радиоактивный изотоп ^3_1T (тритий); стабильный изотоп фосфора $^{31}_{15}\text{P}$, радиоактивные изотопы $^{28}_{15}\text{P}$, $^{29}_{15}\text{P}$, $^{30}_{15}\text{P}$, $^{31}_{15}\text{P}$, $^{32}_{15}\text{P}$, $^{33}_{15}\text{P}$; стабильный изотоп иода $^{127}_{53}\text{I}$, радиоактивные изотопы $^{125}_{53}\text{I}$, $^{131}_{53}\text{I}$ и $^{132}_{53}\text{I}$. Радиоактивные изотопы ^3_1T , $^{32}_{15}\text{P}$, $^{125}_{53}\text{I}$ и $^{131}_{53}\text{I}$ широко применяются в биомедицинских исследованиях. Радиоактивность – самопроизвольное превращение неустойчивого изотопа одного химического элемента в изотоп другого элемента, сопровождающееся испусканием элементарных частиц. Радиоактивные изотопы отличаются нестабильностью и через определенное время подвергаются самопроизвольному радиоактивному распаду и превращению в другие элементы. Нестабильность радиоактивного изотопа связана с избытком или недостатком нейтронов в ядре атома. Нестабильное состояние ядра приводит к его спонтанной перестройке, или радиоактивному распаду.

Изотоп, несущий избыток нейтронов, подвергается радиоактивному распаду, в ходе которого нейтрон преобразуется в пару протон и электрон. При этом электрон испускается атомом ($n \rightarrow p + e^-$). Испускаемые электроны в данном случае называют β -частицами, а радиоактивное преобразование ядра изотопа – β -распадом. После преобразования нейтрона в ядре появляется дополнительный протон, и радиоактивный атом преобразуется в следующий

по порядку атом периодической системы элементов. В случае атома фосфора $^{32}_{15}\text{P}$ его β -распад приводит к превращению в атом серы: $^{32}_{15}\text{P} \rightarrow ^{32}_{16}\text{S}^+ + \beta^- + \bar{\nu}$, где β^- – испускаемый электрон, $\bar{\nu}$ – нейтрино, испускаемая из ядра частица ничтожной массы. В результате распада образуется ион серы $^{32}_{16}\text{S}^+$, поскольку от фосфора остается 15 электронов вместо характерных для серы 16-ти.

Недостаток нейтронов в атоме также обуславливает его нестабильность. Например, характерный для изотопа иода $^{125}_{53}\text{I}$ недостаток двух нейтронов (стабильный элемент $^{127}_{53}\text{I}$) приводит к спонтанному преобразованию атома, при котором, однако, образуется не протон, а нейтрон. Нейтрон образуется при захвате ближайшего к ядру электрона протоном ($p + e^- \rightarrow n$). При данном варианте β -распада атом переходит из состояния с большей энергией к состоянию с меньшей энергией. Избыточная энергия испускается в виде электромагнитного мягкого γ -излучения. Поскольку после захвата электрона ближайшая к ядру орбиталь электронов оказывается незаполненной и ее заполняет электрон с ближайшей орбиты, освободившееся место занимает электрон с более отдаленной орбиты и т.д. Каждый электронный переход приводит к испусканию рентгеновского излучения (X). В процессе радиоактивного преобразования атома часть энергии γ -излучения передается одному из электронов наружной орбиты. Поскольку на этой орбите электроны слабо связаны с ядром, они испускаются атомом в виде мягкого β -излучения. В этом случае (в отличие от ядерных β -частиц) β -частицы обладают низкой энергией, близкой по значению к энергии β -частиц трития. Уравнение радиоактивного превращения (или радиоактивного распада – поскольку энергия выделяется) можно представить следующим образом: $^{125}_{53}\text{I} \rightarrow ^{125}_{52}\text{Te} + \gamma + X + \beta^-$, где γ – мягкое γ -излучение, X – рентгеновское излучение, β^- – мягкое β -излучение. Изменение заряда ядра при данном варианте β -распада приводит к образованию элемента, предшествующего исходному в периодической системе.

Для различных биомедицинских исследований нередко оказывается необходимым ввести в состав антител или других белков радиоактивную метку. Используемые в молекулярной биологии методы детекции, основанные на применении радиоактивных изотопов, отличаются самой высокой чувствительностью. Наиболее часто применяют изотопы ^{131}I (период полураспада (п.п.) 8 сут.), ^{32}P (п.п. 14,3 сут.), ^{125}I (п.п. 60 сут.), ^{35}S (п.п. 87,5 сут.), ^3H (тритий, п.п. 12,3 лет), ^{14}C (п.п. 5730 лет). Изотопы ^3H и ^{14}C испускают β -частицы (электроны, выбрасываемые из ядер в процессе радиоактивной трансформации), которые детектируются с помощью радиоактивных счетчиков по флуоресценции, которую эти частицы индуцируют в специальных сцинтилляционных растворах. Изотоп ^{125}I испускает γ -излучение (электромагнитное излучение, испускаемое ядром атома), и его преимуществами являются относительно короткий период полураспада (60 сут.) и возможность прямой детекции без использования сцинтиллятора. Изотоп ^{125}I наиболее часто применяется при радиоиммуноанализах, а также для исследования лиганд-рецепторных взаимодействий. В

состав антител ^{125}I может быть введен с помощью реагента Болтона–Хантера (рис. 68). Изотоп ^{131}I обладает более коротким периодом полураспада и более проникающим излучением по сравнению с ^{125}I , что требует большей осторожности при работе с препаратом и дополнительных мер по защите персонала.

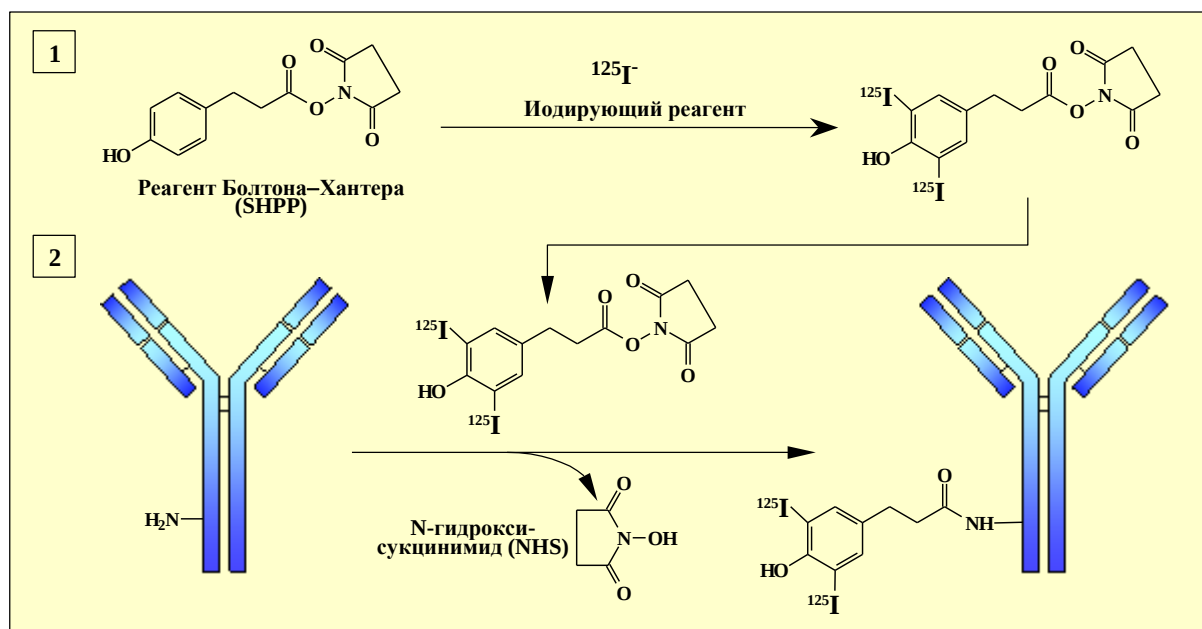
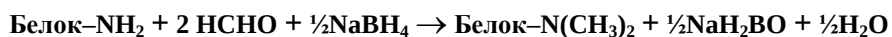


Рис. 68. Иодирование антител с помощью реагента Болтона–Хантера (N-сукцинимидил-3-[4-гидроксифенил]пропионата, SHPP).

Для исследования фармакокинетических параметров (всасывание, распределение, метаболизм, экскреция) вещества обычно метят изотопом ^{14}C или тритием. Также с помощью этих изотопов можно исследовать тканевое распределение вещества и идентифицировать продукты его деградации. Для введения изотопов ^3H и ^{14}C в белки используют боргидрид натрия и формальдегид. Введение радиоактивной метки происходит в ходе реакции метилирования свободных аминогрупп белка:



Как видно из схемы реакции, изотоп ^{14}C может быть введен в белковую молекулу из меченого ^{14}C формальдегида, а тритий как из меченого формальдегида, так и боргидрида натрия.

Радиоактивно меченые белки и другие вещества также используют в методе конкурентного иммуноанализа, позволяющего определять концентрации антигена в биологических жидкостях (рис. 69 А). Меченые белки (например, цитокины) широко используют и в конкурентном радиорецепторном анализе для определения их концентрации, изучения кинетики связывания со специфическими рецепторами, а также выявления изотипов или растворимых форм рецепторов (рис. 69 Б).

С помощью изотопов ^3H , ^{32}P , ^{33}P можно также исследовать структуру и функции

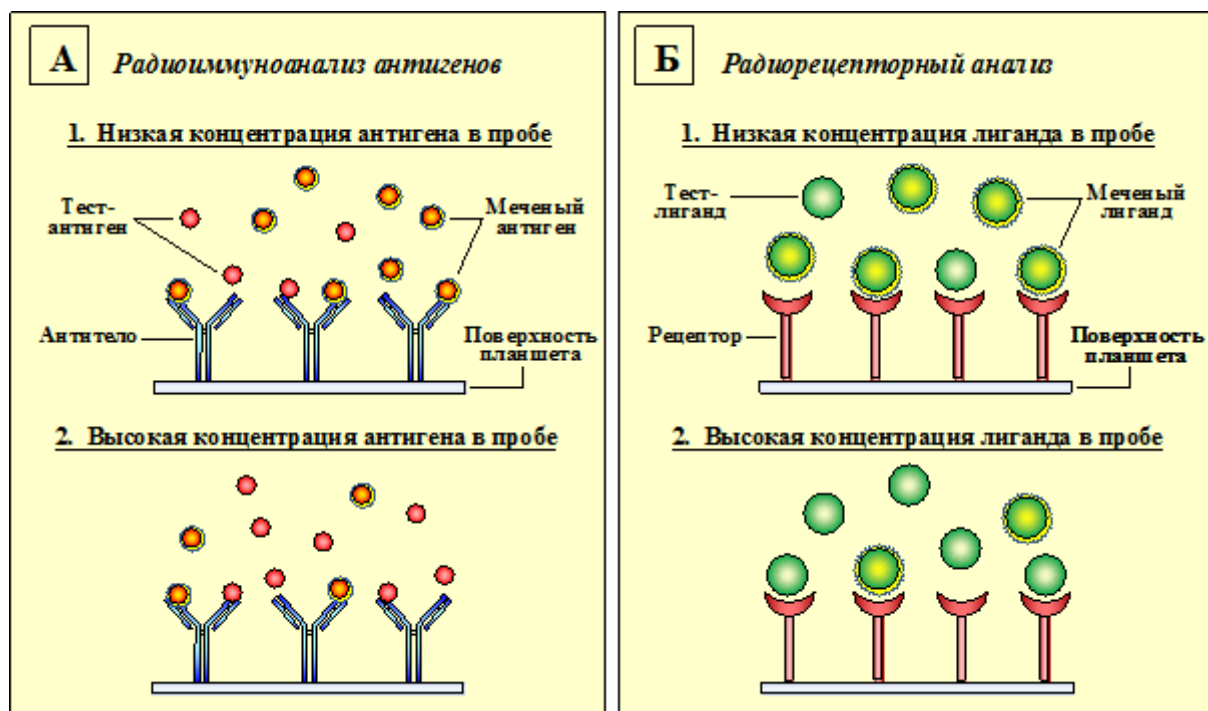


Рис. 69. Разъяснение принципа действия метода конкурентного связывания в радиоиммуноанализе (А) и радиорецепторном анализе (Б). Исследуемые растворы антигенов (лигандов), смешанных с радиоактивной меткой, вносят в лунки планшетов, на поверхности которых иммобилизованы антитела (А) или рецепторы (Б). Принцип метода заключается в том, что чем выше концентрация немеченого антигена в пробе, тем меньше радиоактивно меченного антигена окажется связанным с антителами или рецепторами. С помощью калибровочной кривой, выражающей зависимость уровня радиоактивности в образце от концентрации немеченого («холодного») антигена (лиганда), можно определять концентрации антигенов и лигандов в биологических жидкостях. С помощью радиорецепторного анализа выявляют изоформы рецепторов, изучают кинетику лиганд-рецепторных взаимодействий, а также определяют плотность рецепторов на поверхности клетки.

белков и нуклеиновых кислот. Для этого меченые аминокислоты или нуклеотиды могут включаться в состав белков или нуклеиновых кислот в процессе их синтеза. Изотопы ^{14}C , ^{32}P и ^{33}P применяют для исследования активности различных ферментов путем измерения скорости модификации меченого субстрата либо скорости появления меченого продукта. Помимо уже отмеченных изотопов для изучения белков также используют изотоп ^{35}S (L- ^{35}S -метионин).

Для идентификации рецепторов на поверхности клетки и белков после их электрофоретического разделения и электропереноса (блоттинга) на нитроцеллюлозную мембрану широко применяют антитела, меченные ^{125}I . В последнем случае после инкубации нитроцеллюлозной мембраны с ^{125}I -мечеными антителами к исследуемому белку отмывают несвязавшиеся антитела, на высушенную мембрану накладывают рентгеновскую пленку, инкубируют в специальном планшете в условиях темноты и после проявления пленки идентифицируют белок (метод радиоавтографии) (рис. 70).

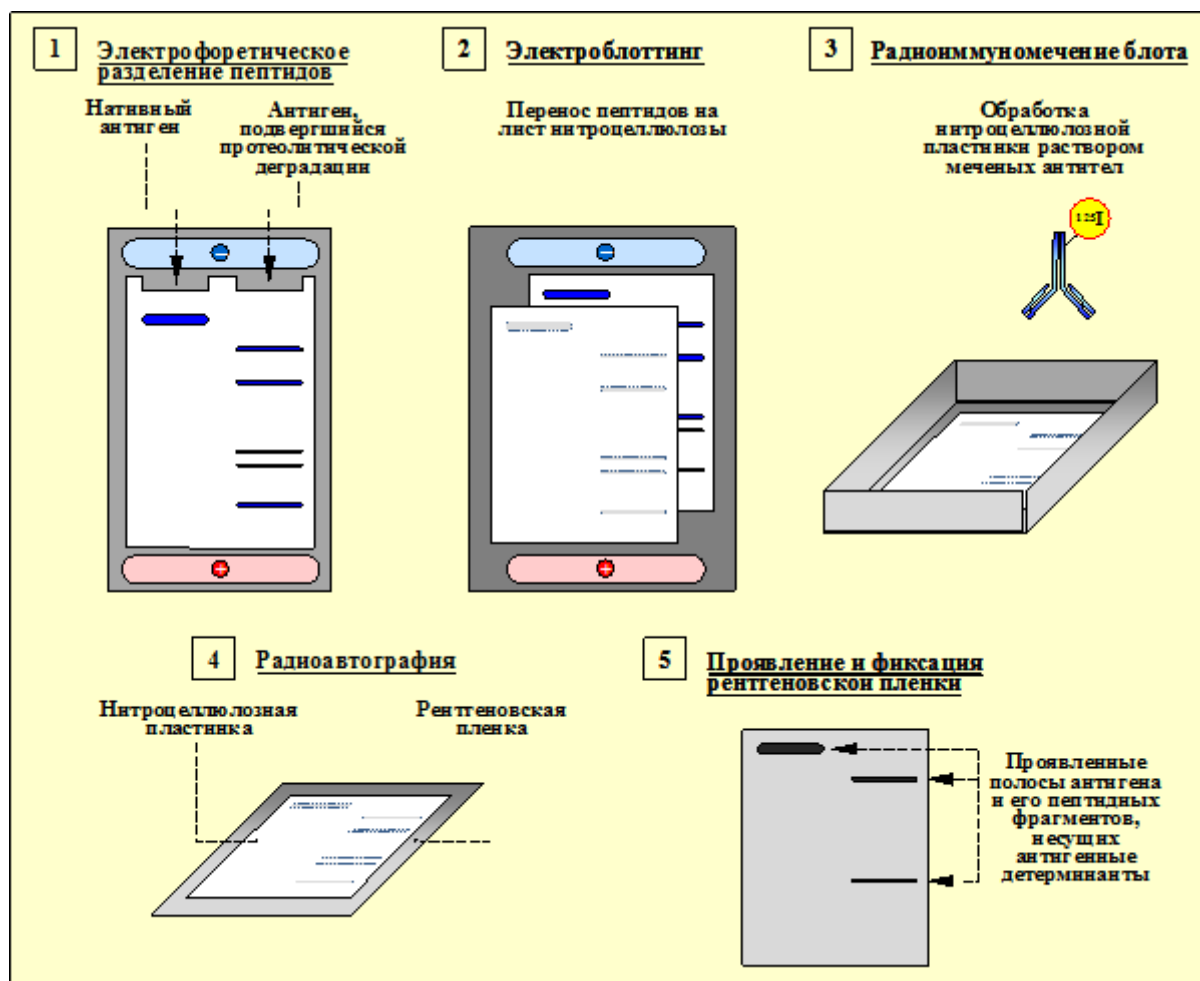


Рис. 70. Схематическое изображение последовательных этапов анализа пептидных фрагментов антигена на наличие антигенных детерминант с помощью радиоиммуноблоттинга. 1. Разделение исследуемых фрагментов с помощью методов изоэлектрофокусирования, нативного или ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле (ДСН – додецилсульфат натрия). 2. Гель, содержащий полосы антигена и его фрагментов, помещают в специальную камеру для электроблоттинга, поверх геля накладывают нитроцеллюлозную пластинку и осуществляют электроперенос пептидов с геля на пластинку. 3. Нитроцеллюлозную пластинку помещают в емкость с буферным раствором и обрабатывают раствором альбумина, который, прочно связываясь с нитроцеллюлозой, препятствует неспецифическому связыванию антител с пластиной. Затем добавляют радиоактивно меченые антитела, отмывают не связавшийся с антигеном материал и пластинку высушивают. 4. Нитроцеллюлозную пластинку помещают в условиях темноты в специальный планшет на лист рентгеновской пленки для радиоавтографии. После определенного времени экспозиции пленку извлекают и проявляют. 5. На пленке четко видны места локализации антигена и продуктов его протеолитической деградации, несущих антигенные детерминанты. При использовании флуоресцентно меченых антител антиген можно выявлять прямо на нитроцеллюлозной пластинке с помощью специальной лампы.

Важным применением радиоактивно меченых веществ является также возможность определения с их помощью в сыворотке крови или других биологических жидкостях концентрации растворимых форм рецепторов, цитокинов, гормонов и витаминов,

присутствующих даже в следовых количествах. Обычно для измерения концентрации и изучения этих веществ используют радиоиммуноанализ, анализ конкурентного связывания белков, анализ лиганд–рецепторных взаимодействий, ферментативные анализы, анализы белок–белковых и ДНК–белковых взаимодействий. Радиоактивная метка может быть введена в белок ферментативным путем, например, путем фосфорилирования белка цАМФ-зависимой протеинкиназой (протеинкиназа А), использующей в качестве субстрата [$\gamma^{32}\text{P}$]-АТФ.

Таким образом, изотопы в настоящее время широко применяются в различных областях биологических и медицинских наук. Как и в конце прошлого столетия, в настоящее время применяются различные техники мечения антител радиоизотопами, и полученные препараты используются в высокочувствительных биологических тестах и радиоиммуноаналитических исследованиях. Однако в наши дни мечение антител такими радиоизотопами, как ^{125}I , применяется не часто, что связано с необходимостью оборудования специальных помещений для работы и потенциальной опасностью для здоровья персонала, создаваемой при небрежном обращении с радиоактивными препаратами. Кроме того, необходимо строго соблюдать условия безопасной утилизации радиоактивных отходов. Однако изотопы с менее жестким излучением, чем ^{125}I , по-прежнему широко применяются для мечения антител, которые затем используются в экспериментах *in vivo* и различных тест-системах. Несмотря на определенные недостатки и потенциальную опасность, очевидно, что радиоизотопы и в дальнейшем будут применяться в биологии и медицине, поскольку на их свойства не влияют конформационные изменения белков и антител, входящих в состав радиоконьюгатов, белки не могут создать стерических препятствий для радиоизлучений и, кроме того, при использовании радиоактивных меток достигается очень высокий уровень чувствительности аналитических методов, чаще всего превосходящий уровень, достигаемый с помощью флуоресцентных красителей.

Принципы терапевтического применения радиоиммуноконъюгатов

Одним из перспективных направлений радиотерапии онкологических заболеваний является разработка и изучение эффективности действия радиоконьюгатов, в которых в качестве носителей радионуклидов, распознающих опухолевые клетки, применяются антитела и другие векторные белки. Для создания радиоиммуноконъюгатов принципиально важным моментом является рациональный выбор векторной молекулы. Как правило, подбирают антитела, которые сами по себе обладают противоопухолевой активностью, так что нагрузка таких антител радиоактивными изотопами (рис. 65 А, рис. 68) должна только усиливать терапевтический эффект. Как правило, терапевтическая эффективность радиоиммуноконъюгатов значительно превышает эффективность свободных антител, входящих в состав конъюгата, однако при этом также значительно возрастает гематологическая токсичность, вызываемая радионуклидами, поэтому при разработке препаратов следует учитывать и этот факт.

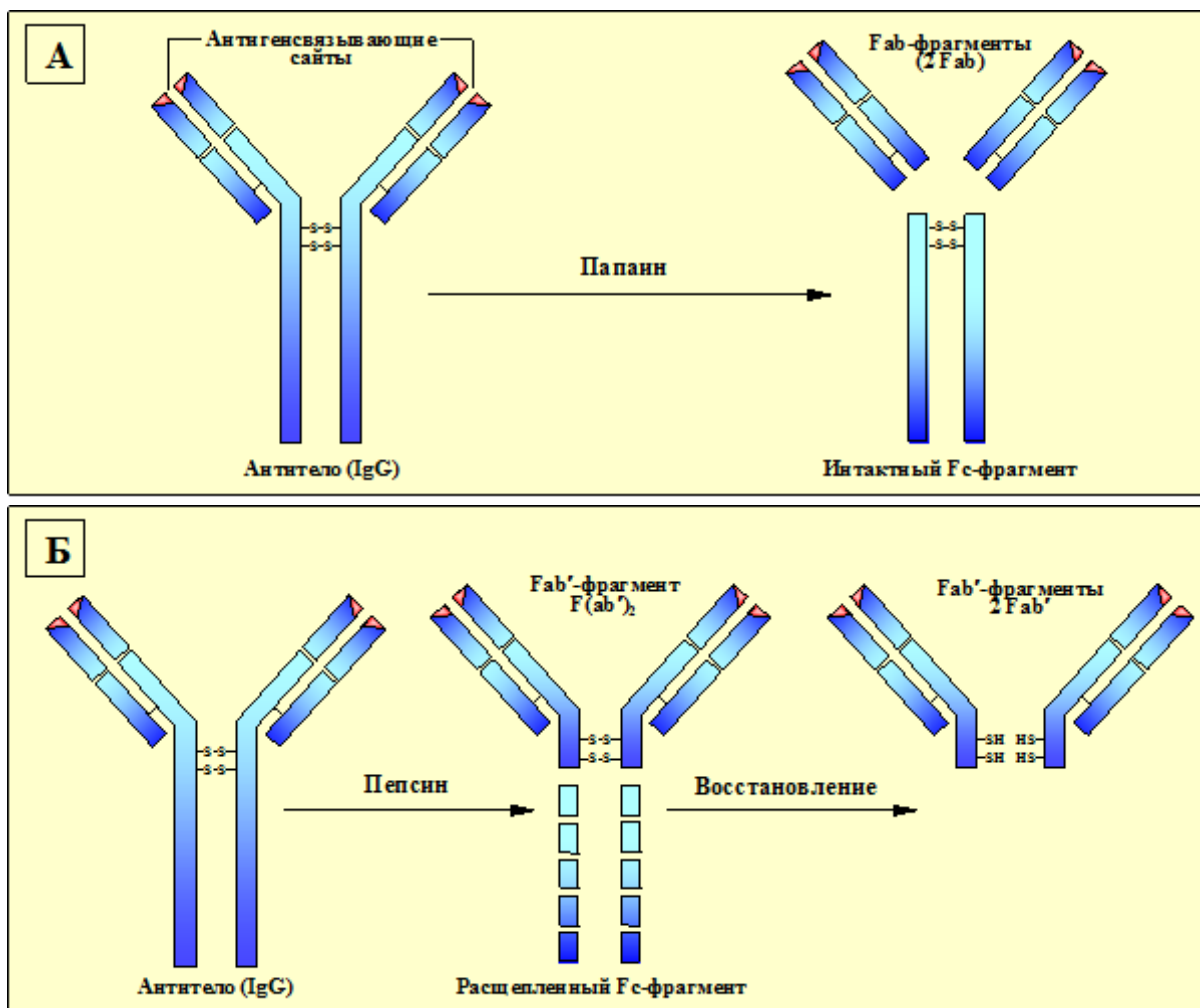


Рис. 71. Получение фрагментов антител (IgG) с помощью ограниченного протеолиза папаином (А) и пепсином (Б). А. В результате расщепления тяжелых цепей IgG в шарнирном участке последовательности, расположенном выше межмолекулярных дисульфидных мостиков, образуются два фрагмента, называемых «Fab-фрагментами». Каждый из этих фрагментов содержит по участку последовательности легкой и тяжелой цепи, связанных дисульфидным мостиком. Каждый из Fab-фрагментов содержит также по одному идентичному антигенсвязывающему сайту, совместно формируемому из вариабельных участков последовательностей легкой и тяжелой цепей. Помимо Fab-фрагментов, в результате протеолиза образуется интактный Fc-фрагмент. Б. При ограниченном протеолитическом расщеплении IgG пепсином происходит расщепление тяжелых цепей в шарнирном участке последовательности, расположенном ниже межмолекулярных дисульфидных мостиков. В результате образуется бивалентный антигенсвязывающий фрагмент $F(ab')_2$ и небольшие пептиды – продукты расщепления Fc-фрагмента. Восстановление межмолекулярных дисульфидных связей, локализованных в фрагменте $F(ab')_2$, приводит к образованию двух моновалентных Fab'-фрагментов (2 Fab'). Fab-фрагменты широко используются для получения конъюгатов с растительными и бактериальными токсинами, химиопрепаратами, носителями радионуклидов, белками и пептидами.

В отличие от лучевой терапии, при которой высокой дозой радиации облучают опухоль, при проведении радиоиммунотерапии препарат вводят внутривенно, и

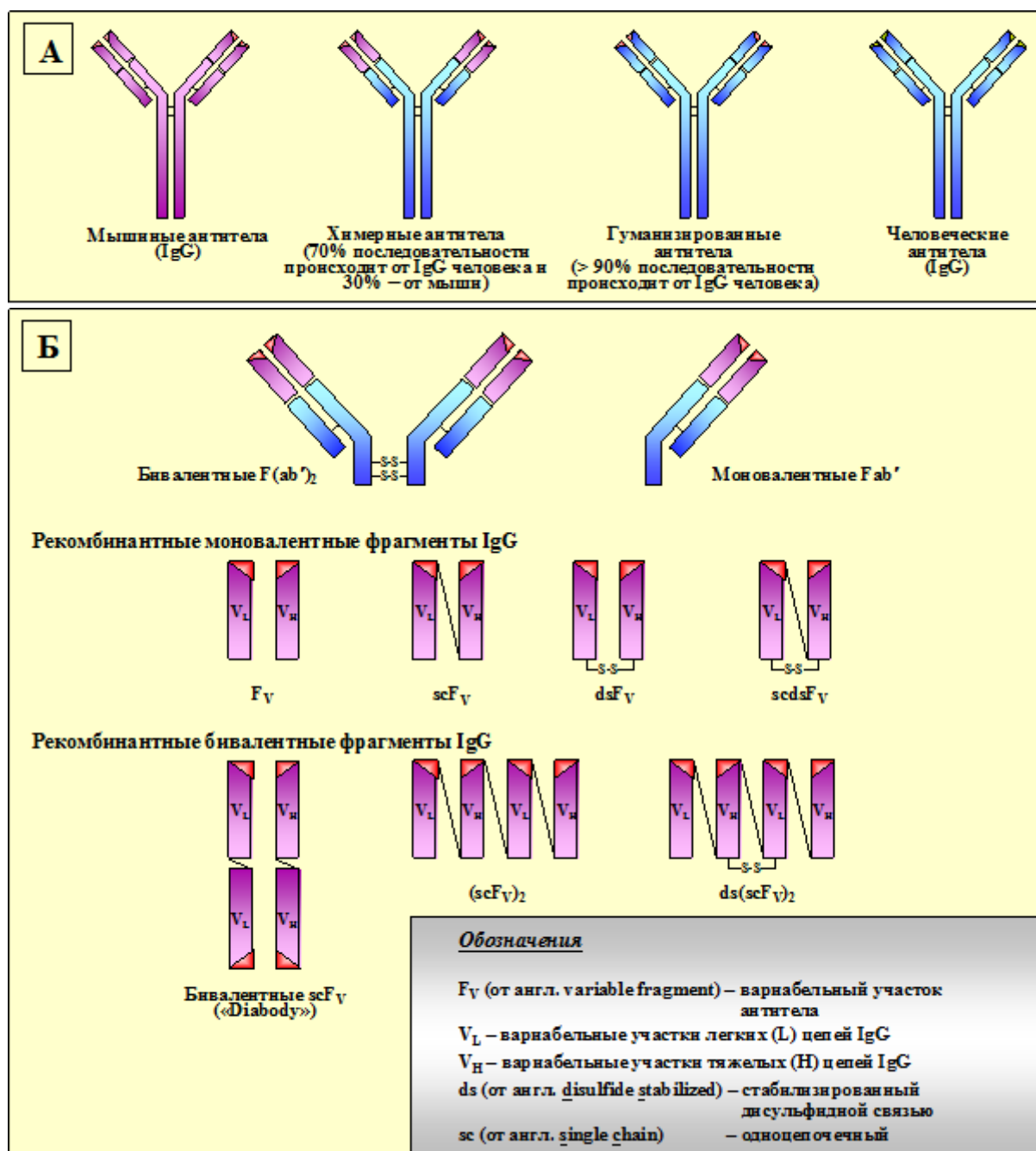


Рис. 72. Рекомбинантные антитела (А) и их фрагменты (Б), применяемые для получения противоопухолевых конъюгатов с токсинами, химиопрепаратами и носителями радионуклидов. Свободные антитела и их фрагменты также применяются в онкологии в качестве противоопухолевых препаратов. Бивалентные и моновалентные Fab-фрагменты хорошо проникают в опухолевую ткань и проявляют высокую терапевтическую активность, несмотря на более короткое время циркуляции в крови по сравнению с интактными IgG. На основе различных моновалентных и бивалентных фрагментов IgG создаются и активно исследуются противоопухолевые препараты.

радиоиммуноконъюгат постепенно накапливается в опухоли, достигая в течение 1–2 дней максимального уровня накопления, часто составляющего менее 0,01% от общей дозы

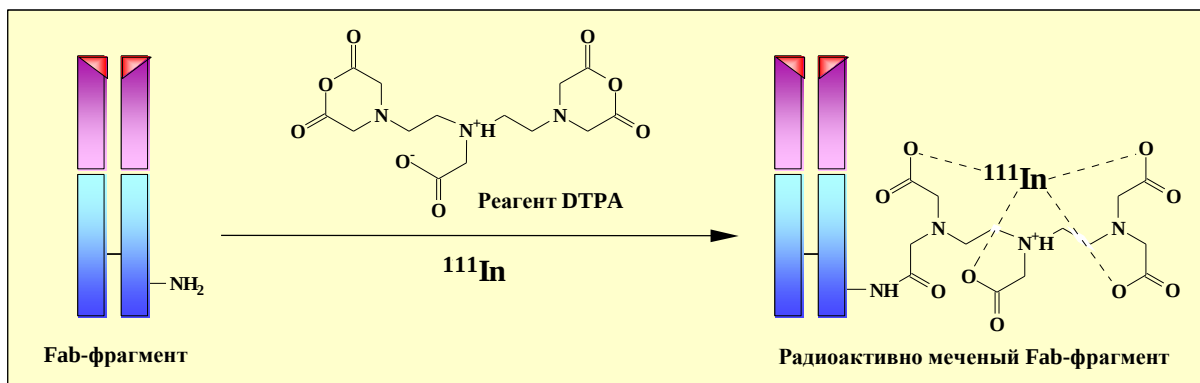


Рис. 73. Схема реакции модификации Fab-фрагментов IgG с помощью реагента DTPA (диэтиленetriаминпентауксусная кислота) с последующим присоединением радионуклида ^{111}In . Радиоактивно меченые антитела могут быть использованы в качестве диагностического или противоопухолевого препарата направленного действия, в котором антитело выполняет роль векторной молекулы, распознающей специфический антиген на поверхности опухолевой клетки.

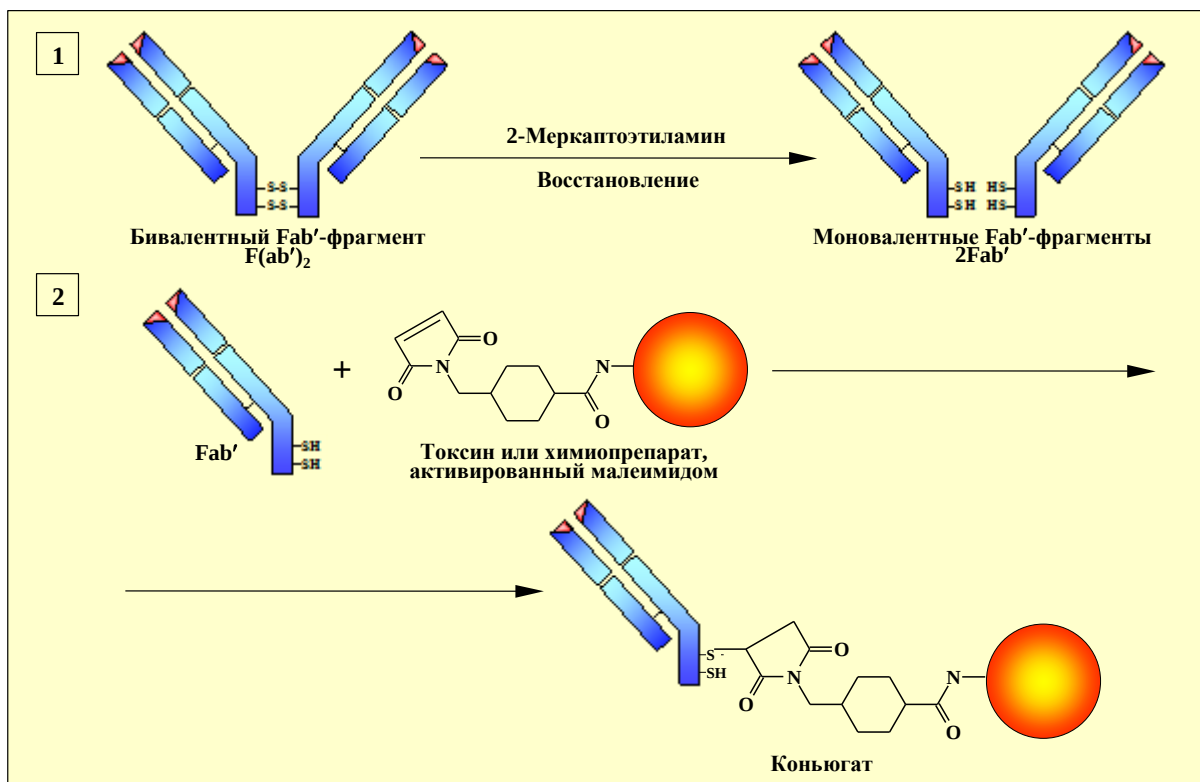


Рис. 74. Получение конъюгатов Fab'-фрагментов с токсинами или химиопрепаратами. После ограниченного протеолиза IgG пепсином и восстановления дисульфидных связей, стабилизирующих бивалентный фрагмент F(ab')_2 образуются моновалентные Fab'-фрагменты со свободными тиольными группами (1). Эти Fab'-фрагменты могут образовывать конъюгаты с активированными малеимидом токсинами или химиопрепаратами (2).

введенного препарата. При выборе радионуклидов для создания конъюгатов прежде всего руководствуются размером опухоли, которая будет подвергаться терапии. Размер опухоли

имеет важное значение, поскольку радиоактивные излучения изотопов, применяемых в медицине, обладают разной энергией и проникающей способностью. Так, например, изотоп ^{131}I испускает β -излучение средней энергии (0,5 МэВ), которое может проникать в ткань на глубину 1 мм, тогда как изотоп ^{90}Y испускает β -излучение высокой энергии (2,1 МэВ), способное проникать уже на глубину до 10 мм. Несмотря на высокую проникающую способность β -излучения высокой энергии, его поражающая способность в отношении опухолевых клеток ниже, чем β -излучения средней энергии. Возможно, что более высокая поражающая способность β -излучения средней энергии связана с сильным повреждающим воздействием на ДНК опухолевых клеток. Еще более мощным повреждающим действием на клетки по сравнению с β -излучением высокой и средней энергии обладает α -излучение, испускаемое такими изотопами, как ^{211}At и ^{213}Bi . При этом α -излучение обладает значительно более низкой проникающей способностью по сравнению с β -излучениями

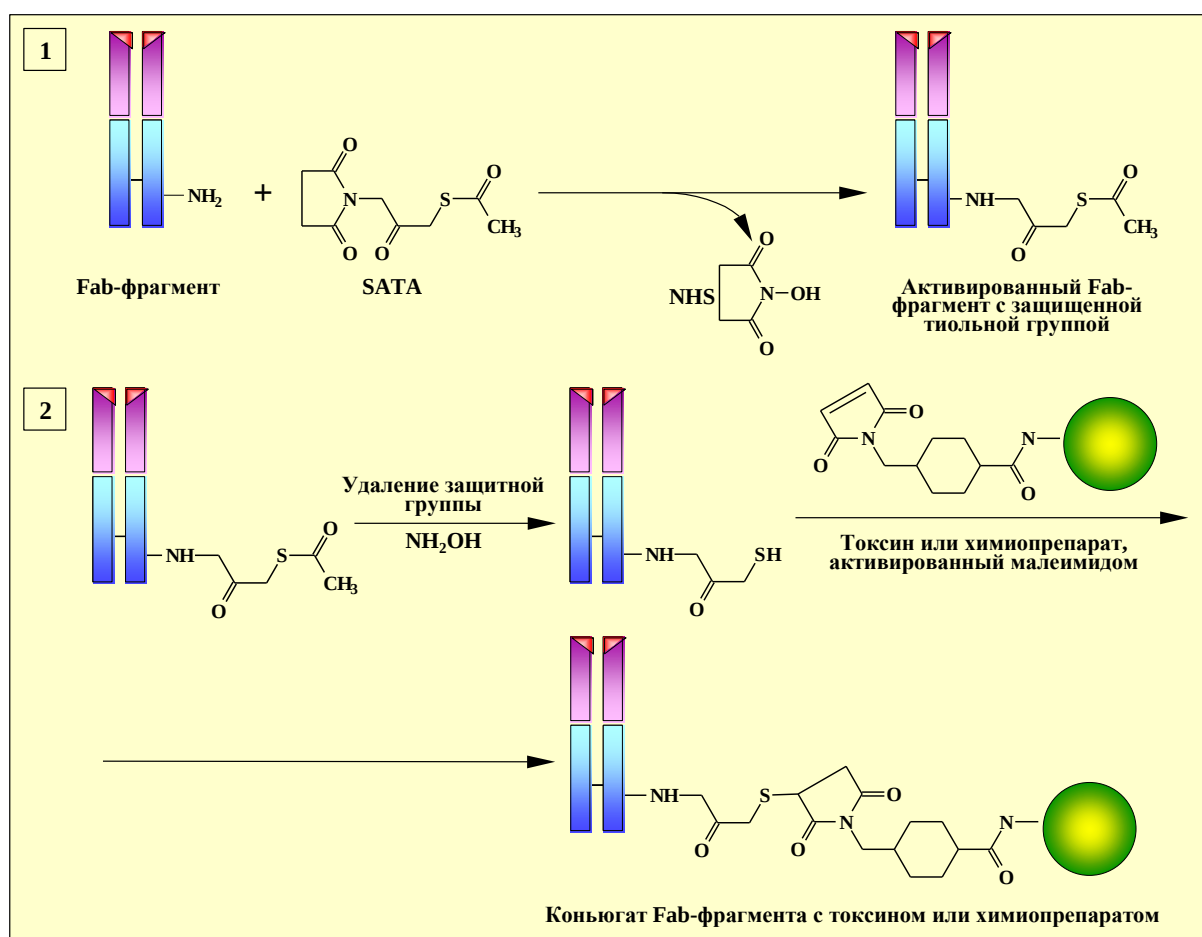


Рис. 75. Получение конъюгатов Fab-фрагментов с токсинами или химиопрепаратами. Fab-фрагменты получают ограниченным протеолизом IgG папаином. При модификации NH_2 -групп Fab-фрагмента в его состав предварительно с помощью реагента SATA вводят защищенную тиольную группу (1). Далее удаляют защитную группу и модифицированный Fab-фрагмент конъюгируют с активированным малеимидом токсином или химиопрепаратом (2). В результате получают конъюгат, стабилизированный прочной тиоэфирной связью.

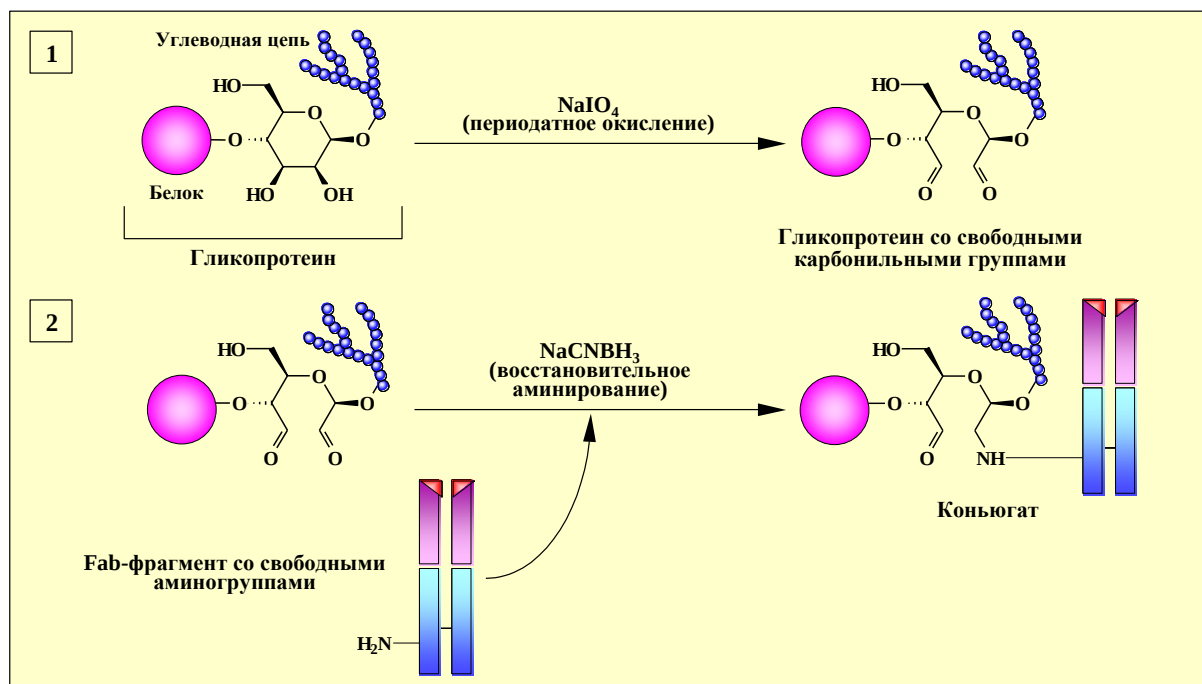


Рис. 76. Получение конъюгатов Fab-фрагментов с гликопротеинами. Предварительно проводят периодатное окисление углеводных цепей гликопротеина с образованием альдегидных групп (1). Затем путем восстановительного аминирования получают стабильный ковалентный конъюгат Fab-фрагмента с гликопротеином (2).

высокой и средней энергии и проникает в ткань на глубину лишь нескольких клеточных слоев. Также низкой проникающей способностью обладают испускаемые изотопами ^{111}In и ^{125}I β -частицы низкой энергии. Для проявления цитотоксического эффекта в отношении опухолевых клеток радионуклиды, испускающие β -частицы низкой энергии, должны располагаться в непосредственной близости от поверхности клетки, а еще предпочтительнее— внутри нее. Таким образом, изотопы, испускающие α -частицы и β -частицы низкой энергии, следует применять либо на самых ранних стадиях развития онкологических заболеваний, либо при лейкемии или злокачественном асците, когда в организме присутствуют лишь одиночные клетки или их небольшие скопления. Применение изотопов, испускающих β -излучение средней и высокой энергии, будет наиболее эффективным в отношении опухолей, диаметр которых составляет 0,5 см и более.

Одним из существенных недостатков радиоиммуноконъюгатов является довольно длительный период циркуляции в крови. При этом постоянному воздействию подвергается крайне чувствительный к радиации красный костный мозг и развивается дозолимитирующая миелосупрессия. В связи с этим для получения радиоиммуноконъюгатов часто используют не полноразмерные антитела, а их Fab-фрагменты (рис. 71-73), которые значительно быстрее выводятся из кровотока. Необходимо отметить, что Fab-фрагменты широко применяются в онкологии не только в качестве носителей радионуклидов, но и в виде самостоятельных противоопухолевых препаратов, а также векторных молекул в составе конъюгатов с

токсинами и химиопрепаратами (рис. 74-76). Поскольку вследствие малого размера Fab-фрагменты быстро выводятся из кровотока, при их терапевтическом применении нередко оказывается, что в почках накапливается больше радионуклидов, чем в опухолях.

Биотинилированные антитела

Помимо применения флуорохромов и радиоизотопов для мечения антител и других белков, при создании различных тестовых и диагностических систем часто оказывается необходимым получать конъюгаты антител с биотином и различными ферментами. Биотинилирование антител позволяет присоединять к ним через остаток биотина белки авидин или стрептавидин, связанные с различными метками, ферментами или химиопрепаратами. Авидин представляет собой гликопротеин из яичного белка (мол. масса ~ 66 кДа), состоящий из четырех идентичных субъединиц (мол. масса субъединицы 16,4 кДа). Стрептавидин – гомологичный авидину гликопротеин (мол. масса 60 кДа) из *Streptomyces avidinii*. Авидин имеет четыре сайта связывания с биотином и обладает очень высоким сродством к нему ($K_D=10^{-15}$ М).

В настоящее время во многих иммуноаналитических системах используются биотинилированные антитела и конъюгаты авидина с различными ферментами, флуоресцентными и радиоактивными метками, цветными белками и др. Особенно широко авидин–биотиновая система применяется в некоторых видах иммуноферментного анализа (ИФА, или ELISA (от англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*)) (рис. 77). Существует несколько подходов к применению авидин–биотиновой системы в иммуноанализе, позволяющих существенно повысить чувствительность метода.

В наиболее простом варианте применения авидин–биотиновой системы используются биотинилированные антитела, которые связываются с антигеном, иммобилизованным на поверхности лунки микропланшета. Далее в лунку добавляют конъюгат авидина с ферментом (пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой). После образования комплекса [антиген–биотинилированное антитело–конъюгат авидина с ферментом] в лунку добавляют субстрат, продукты ферментативной модификации которого либо окрашивают раствор, либо проявляют флуоресцентные свойства, что позволяет с помощью соответствующего оборудования выявлять присутствие антигена. Как и в других типах иммуноферментного анализа, с помощью этого метода можно также определять концентрацию антигена (рис. 78 А). В более сложном варианте применения авидин–биотиновой системы используются как биотинилированные антитела, так и биотинилированный фермент (рис. 78 Б). Для проведения иммуноферментного анализа сначала в лунку микропланшета с иммобилизованным на ее поверхности антигеном добавляют биотинилированные антитела. После связывания с антигеном и удаления несвязавшихся антител (смена буферного раствора в лунке) добавляют авидин, который связывается с антителами через остатки биотина. Затем в лунку добавляют биотинилированный фермент. Поскольку молекула авидина после связывания с антителом содержит еще три потенциальных сайта связывания с

биотинилированным ферментом, чувствительность анализа может быть существенно повышена за счет увеличения количества фермента, связанного с комплексом [антиген–антитело–авидин]. После добавления в лунку субстрата, ферментативное преобразование

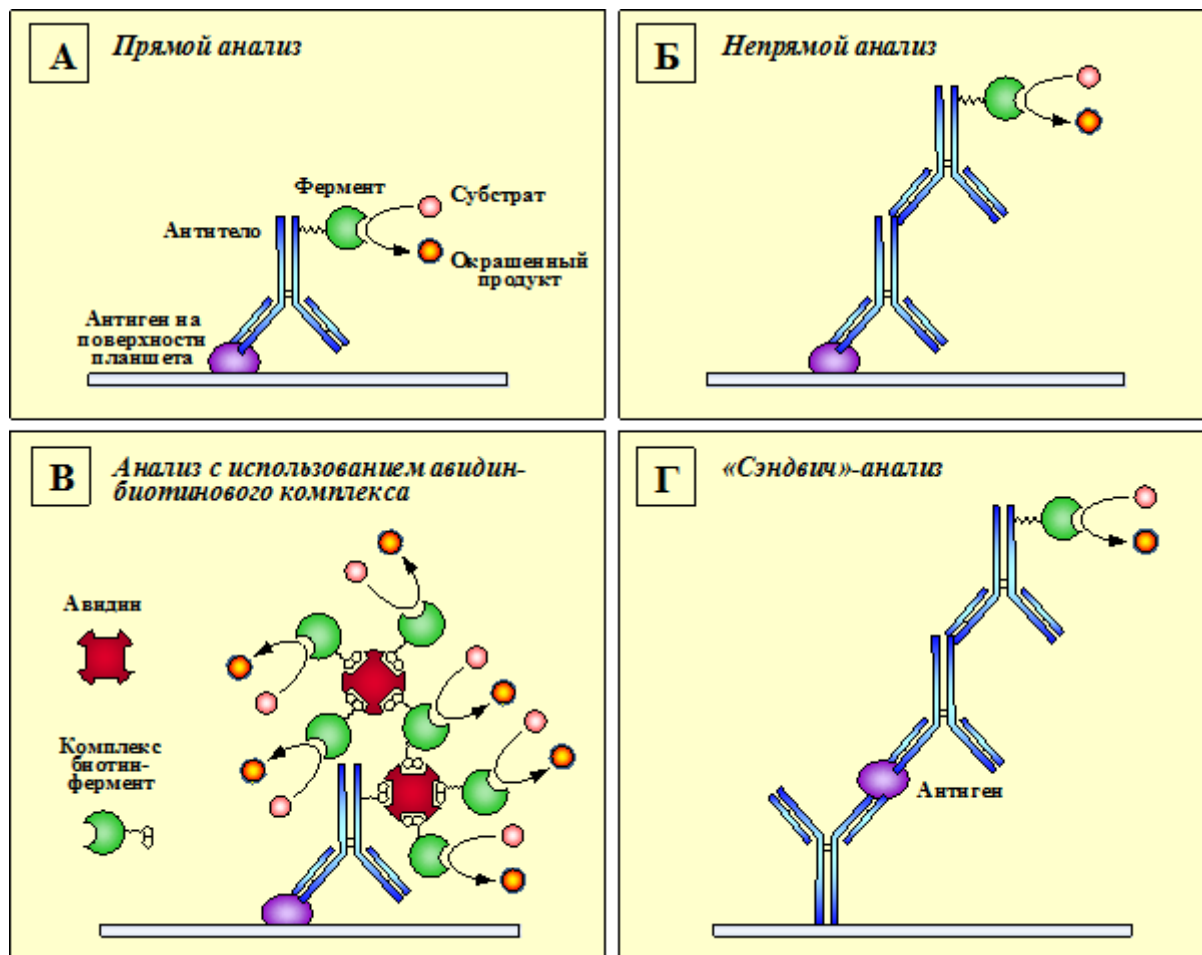


Рис. 77. Различные виды иммуноферментного анализа (ИФА, или ELISA, от англ. enzyme-linked immunosorbent assay). А. При использовании метода прямого иммуноферментного анализа антитело с химически связанным с ним ферментом непосредственно взаимодействует с антигеном, иммобилизованным в лунках специального пластмассового планшета. После удаления несвязавшегося антигена добавляют субстрат фермента, преобразование которого приводит к окрашиванию раствора. Далее фотометрически определяют концентрацию антигена. Б. При непрямом анализе в лунку с иммобилизованным антигеном сначала вносят антиген-специфичные антитела. После удаления несвязавшихся антител путем промывки в лунку добавляют антитела (конъюгат с ферментом), кросс-реактивные к антиген-специфичным антителам. Количественное определение антигена проводят фотометрически. В. При анализе, проводимом с помощью авидин-биотинового комплекса, благодаря наличию в его составе множества сайтов связывания биотинилированного фермента достигается высокая чувствительность метода определения концентрации антигена. Г. «Сэндвич»-анализ (от англ. sandwich – бутерброд) отличается высокой специфичностью, поскольку при его проведении антиген определяется с помощью антител двух типов, которые должны узнавать два неперекрывающихся эпитопа (сайты связывания антител) на поверхности антигена. «Сэндвич»-анализ является наиболее часто используемым методом иммуноферментного анализа.

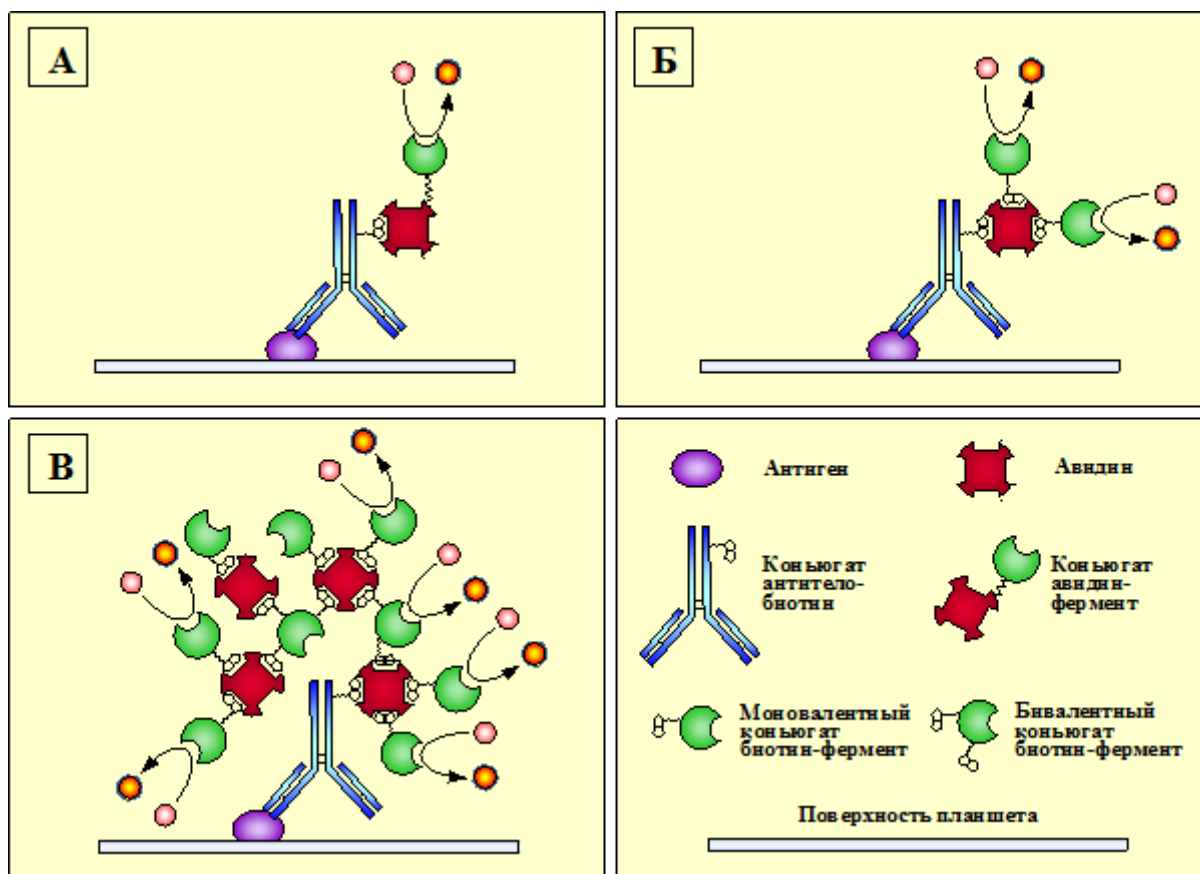


Рис. 78. Основные виды авидин-биотиновых систем иммуноанализа. А. Система анализа LAB (от англ. labeled avidin-biotin assay system). Б. Система анализа BRAB (от англ. bridged avidin-biotin assay system). В. Система анализа ABC (от англ. avidin-biotin complex).

которого приводит к появлению окрашенного или флуоресцентного продукта, с помощью фотометрии или флуориметрии определяют концентрацию антигена. Наиболее высокой чувствительности иммуноферментного анализа с применением авидин-биотиновой системы удастся добиться при последовательном внесении в лунку микропланшета с иммобилизованным антигеном биотинилированных антител и полимера, образованного авидином и биотинилированным ферментом (рис. 78 В). Для получения высокомолекулярного комплекса авидин-фермент перед добавлением к биотинилированным антителам, связанным с антигеном, биотинилированный фермент смешивают с авидином в необходимых пропорциях. Применение в иммуноферментном анализе крупных комплексов авидин-фермент позволяет значительно увеличить количество фермента, необходимого для детектирования антигена, и, таким образом, существенно повысить чувствительность метода.

На принципе прочного взаимодействия авидина с биотином основаны также методы обнаружения фрагментов ДНК. Это бывает необходимо, например, при диагностике вызываемых микроорганизмами заболеваний и выявлении их возбудителей. Для проведения анализа предварительно получают ДНК-зонды, позволяющие выявлять такие

микроорганизмы, как *Plasmodium falciparum* (вызывает малярию), *Salmonella typhi* (пищевые отравления), *Legionella pneumophila* (респираторные заболевания) и многие другие. В основе диагностических методов лежит гибридизация ДНК с ДНК-зондом, заключающаяся в спаривании комплементарных цепей нуклеиновых кислот. Для проведения диагностики одноцепочечную ДНК-мишень фиксируют на мембранном фильтре и обрабатывают меченой одноцепочечной ДНК-зондом, в результате чего происходит спаривание комплементарных цепей. Далее путем промывания фильтра удаляют избыток несвязавшегося зонда. В завершающей фазе анализа проводят детекцию присутствующих на фильтре гибридных молекул.

В настоящее время наиболее широко для гибридизации используют зонды, меченные радиоактивным изотопом фосфора ^{32}P . Меченый зонд гибридизуют с ДНК-мишенью на специальном фильтре и детектируют метку с помощью радиоавтографии. Поскольку распад ^{32}P сопровождается испусканием высокоэнергетического излучения и при работе с этим изотопом необходимо соблюдение специальных мер безопасности, а также обеспечения утилизации радиоактивных отходов, во многих лабораториях все шире используются зонды, содержащие биотинилированные нуклеотиды (рис. 79). Для проведения теста

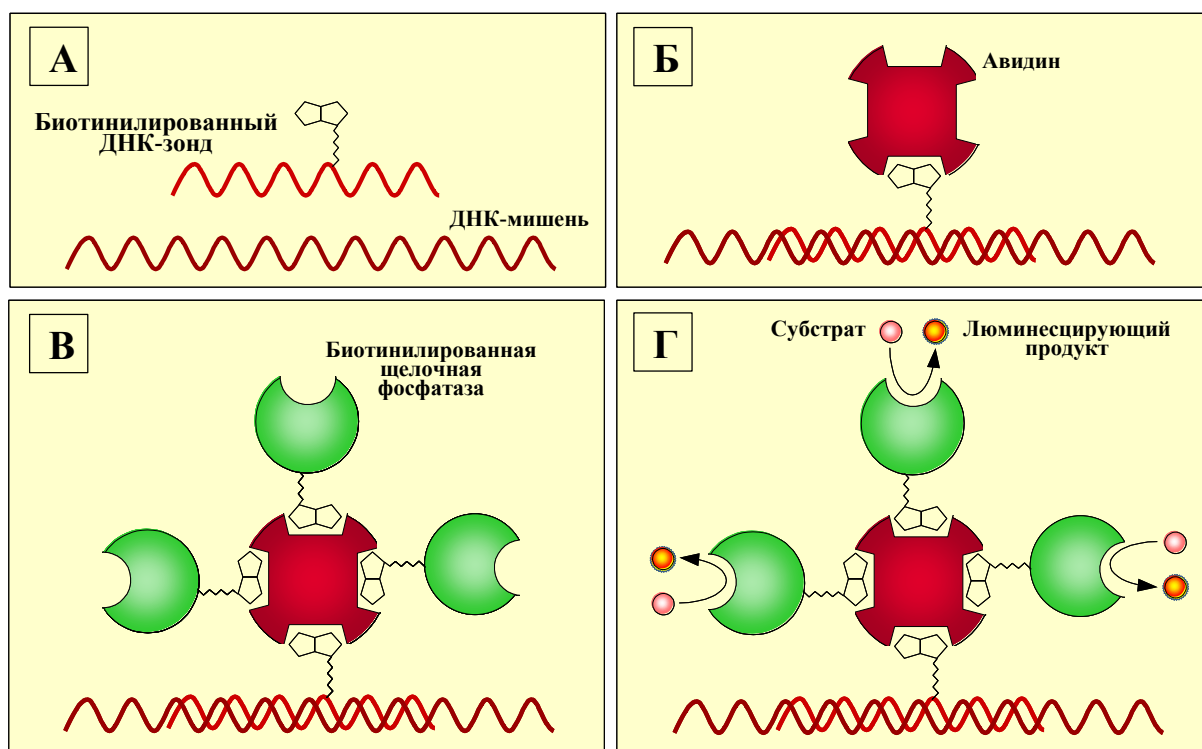


Рис. 79. Схематическое изображение этапов обнаружения ДНК с помощью биотинилированного ДНК-зонда. А. Связывание биотинилированного зонда с комплементарным участком ДНК-мишени. Б. При добавлении авидина образуется прочный нековалентный комплекс авидин-биотин. После связывания с биотином в молекуле авидина содержится еще три свободных центра связывания биотина. В. Биотинилированная щелочная фосфатаза связывается со свободными биотин-связывающими центрами авидина. Г. Добавление субстрата щелочной фосфатазы приводит к образованию люминесцирующего продукта ферментативной реакции, который может быть обнаружен с помощью люминесцентного детектора.

одноцепочечную ДНК-мишень, зафиксированную на мембранном фильтре, гибридуют с ДНК-зондом, меченным биотином. После удаления несвязавшегося зонда путем промывания фильтра последовательно добавляют авидин и биотинилированный фермент (щелочную фосфатазу или пероксидазу хрена). Наконец, после добавления хромогенного или флуорогенного субстрата регистрируют изменение окраски или флуоресценцию. При использовании хромогенных систем детектирования под действием фермента образуется нерастворимый краситель в местах локализации гибридной ДНК. В случае флуорогенной системы детекции под действием фермента образуется флуоресцентный продукт, который можно регистрировать с помощью флуоресцентных детекторов.

В качестве субстрата, образующего после ферментативного превращения пероксидазой окрашенный продукт, широко применяют реагент ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин). Для кинетических исследований также применяют реагенты ABTS (2,2'-азинобис[3-этил-2,3-дигидро-6-бензотиазолсульфоксилота], диаммониевая соль), продукт ферментативного превращения которого имеет зеленый цвет, и OPD (*o*-фенилендиамин дигидрохлорид), продукт которого окрашивает раствор в желто-оранжевый цвет. Наиболее высокая чувствительность (<1 пг/мл) метода иммуноферментного анализа достигается при применении хемилюминесцентных (торговое название «SuperSignal ELISA Pico», компания «Pierce», США) и хемифлуоресцентных («QuantaBlu Substrate», «Pierce», США) субстратов пероксидазы. Следует отметить, что флуоресцентные системы детектирования обладают практически такой же чувствительностью, как и методы детектирования радиоактивного сигнала. В то же время флуоресцентные системы детектирования более чувствительны, чем хромогенные, чем объясняется все более широкое применение именно этих систем в лабораториях. Как уже отмечалось, в иммуноферментном и гибридном анализе применяют ферменты пероксидазу хрена или щелочную фосфатазу, катализирующие образование окрашенных или флуоресцентных продуктов.

Щелочная фосфатаза – белок с мол. массой 140 кДа, выделяемый из кишечника телят. Фермент катализирует гидролитическое отщепление фосфатных групп от молекул субстрата с образованием окрашенных или флуоресцентных продуктов. В качестве субстрата щелочной фосфатазы часто используют хромогенный агент PNPP (*p*-нитрофенилфосфат), при дефосфорилировании которого образуется продукт, окрашивающий раствор в желтый цвет.

Пероксидаза хрена представляет собой белок среднего размера с мол. массой 40 кДа, который катализирует окисление субстратов перекисью водорода с образованием окрашенных или флуоресцентных продуктов:



Концентрация окрашенного продукта, которая может быть определена по светопоглощению, прямо пропорциональна содержанию конъюгата в пробе. В свою очередь, содержание конъюгата при проведении иммуноферментного анализа прямо пропорционально содержанию антигена. Таким образом, концентрацию антигена можно

легко определить по калибровочной кривой, выражающей зависимость концентрации антигена от поглощения света, или оптической плотности раствора. Поглощение света образцом может измеряться непосредственно в микропланшете с помощью специального спектрофотометра.

Одним из важнейших методов экспериментальной и диагностической иммунологии, в котором применяются коньюгаты антител с биотином или ферментами, является

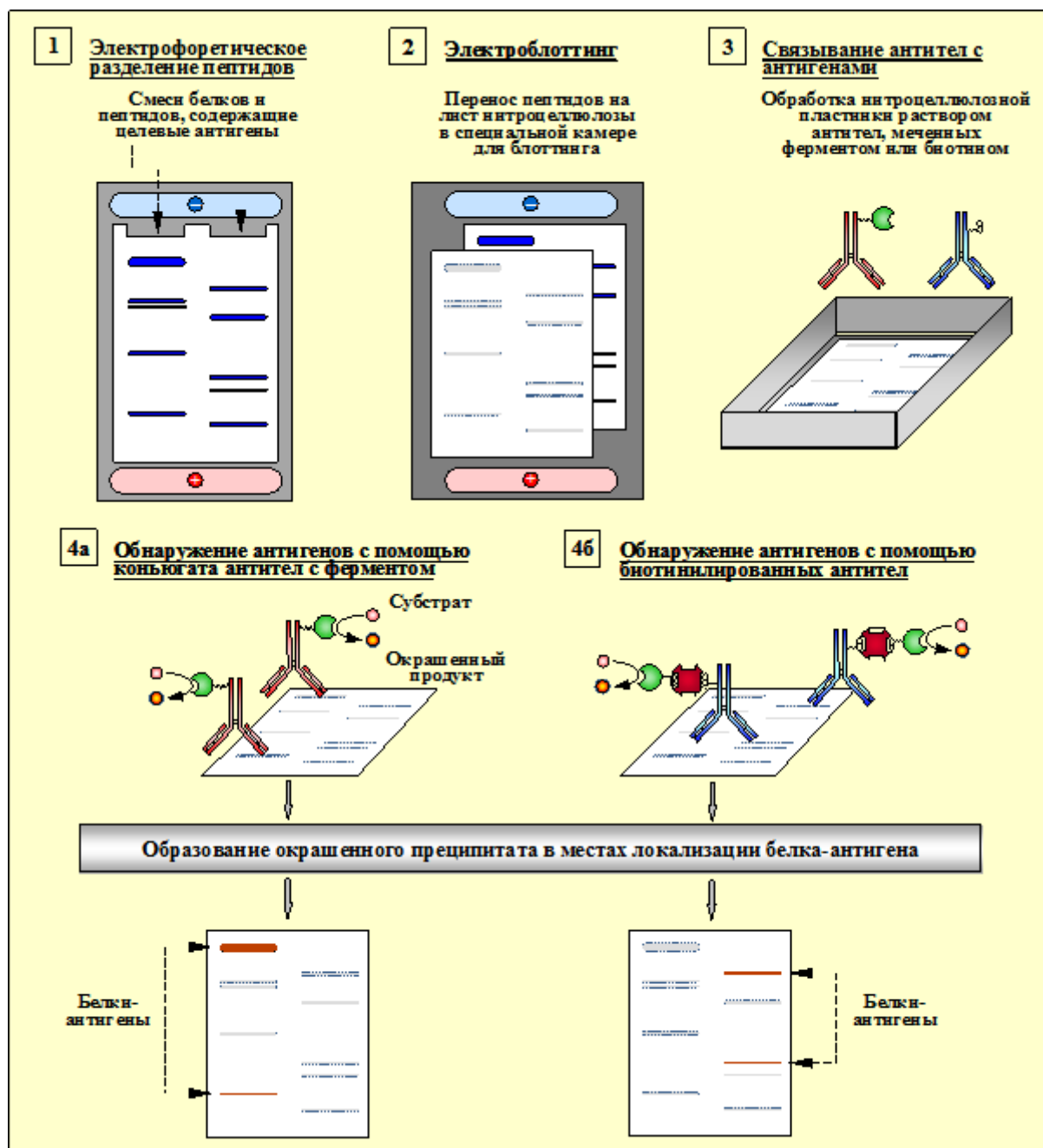


Рис. 80. Схематическое изображение этапов выявления белков-антигенов с помощью метода иммуноблоттинга, или вестерн-блоттинга. Обнаружение белков-антигенов может производиться как с помощью коньюгатов антител с ферментами (4а), так и с помощью биотинилированных антител (4б).

иммуноблоттинг, или вестерн-блоттинг, введенный в лабораторную практику в 1979 г. Английское название метода «Western blotting» использовалось для того, чтобы отличать его от метода «Southern blotting» (Саузерн-блоттинг), названного по имени одного из разработавших его ученых и применяемого для обнаружения специфических нуклеотидных последовательностей. Термин «блоттинг» (от англ. blotting – промокание) относится к переносу белков или нуклеиновых кислот с пластины полиакриламидного геля на специальную мембрану с последующим выявлением и идентификацией этих молекул. Термин «блоттинг» можно также трактовать как перенос макромолекул с пластины геля на полимерную мембрану посредством наложения и «промокания» (получение реплики (отпечатков) имеющихся на геле белковых полос промоканием). Первым этапом процедуры иммуноблоттинга является разделение макромолекул с помощью одного из видов электрофореза в полиакриламидном геле (ДСН-электрофорез, изоэлектрофокусирование, нативный электрофорез) (рис. 80). После электрофореза разделенные молекулы посредством электроблоттинга или пассивной диффузии переносят с пластины полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную (или иную) мембрану. Мембрану обрабатывают альбумином или казеином, чтобы блокировать сайты неспецифичного связывания антител. Далее добавляют специфичные для выявляемого белка антитела, конъюгированные с ферментом. Добавляют субстрат, который конвертируется ферментом в хромогенный или флуорогенный преципитат, образующийся на мембране в местах локализации выявляемого белка. Белок выявляют с помощью колориметрического или флуориметрического детектирования.

В настоящее время антитела широко применяются в различных аналитических системах, играющих важную роль в проведении научно-исследовательских работ в области молекулярной биологии, иммунологии, генетики, биохимии, гистологии и др. Также антитела применяют в высокочувствительных диагностических системах, позволяющих проводить быструю диагностику целого ряда различных патологий. Особое значение имеет разработка подходов к применению антител, в том числе и в составе препаратов направленного действия, для терапии онкологических заболеваний. На этом пути уже достигнуты значительные успехи, и ряд разработанных в последние годы противоопухолевых препаратов уже успешно применяется в клинической практике.

Применение конъюгатов в онкологии

Препараты на основе антител

Еще с конца прошлого столетия проводились активные исследования в области разработки технологий получения и применения в онкологии конъюгатов моноклональных антител с антибиотиками антрациклинового ряда (доксорубицином, даунорубицином, карминомицином). В результате было разработано несколько методов получения таких конъюгатов (рис. 81) и проведено исследование их активности на культурах клеток и лабораторных животных. В настоящее время уже получены препараты, включающие конъюгаты антител не только с антрациклиновыми антибиотиками, но и другими

противоопухолевыми агентами (табл. 2). Некоторые из этих препаратов проходят доклинические и клинические испытания. Так, клинические испытания проходит препарат, включающий конъюгат моноклональных антител к опухолевому антигену Lewis Y (Le^Y) с доксорубицином [273]. Действие этого препарата направлено против опухолей легкого и прямой кишки.

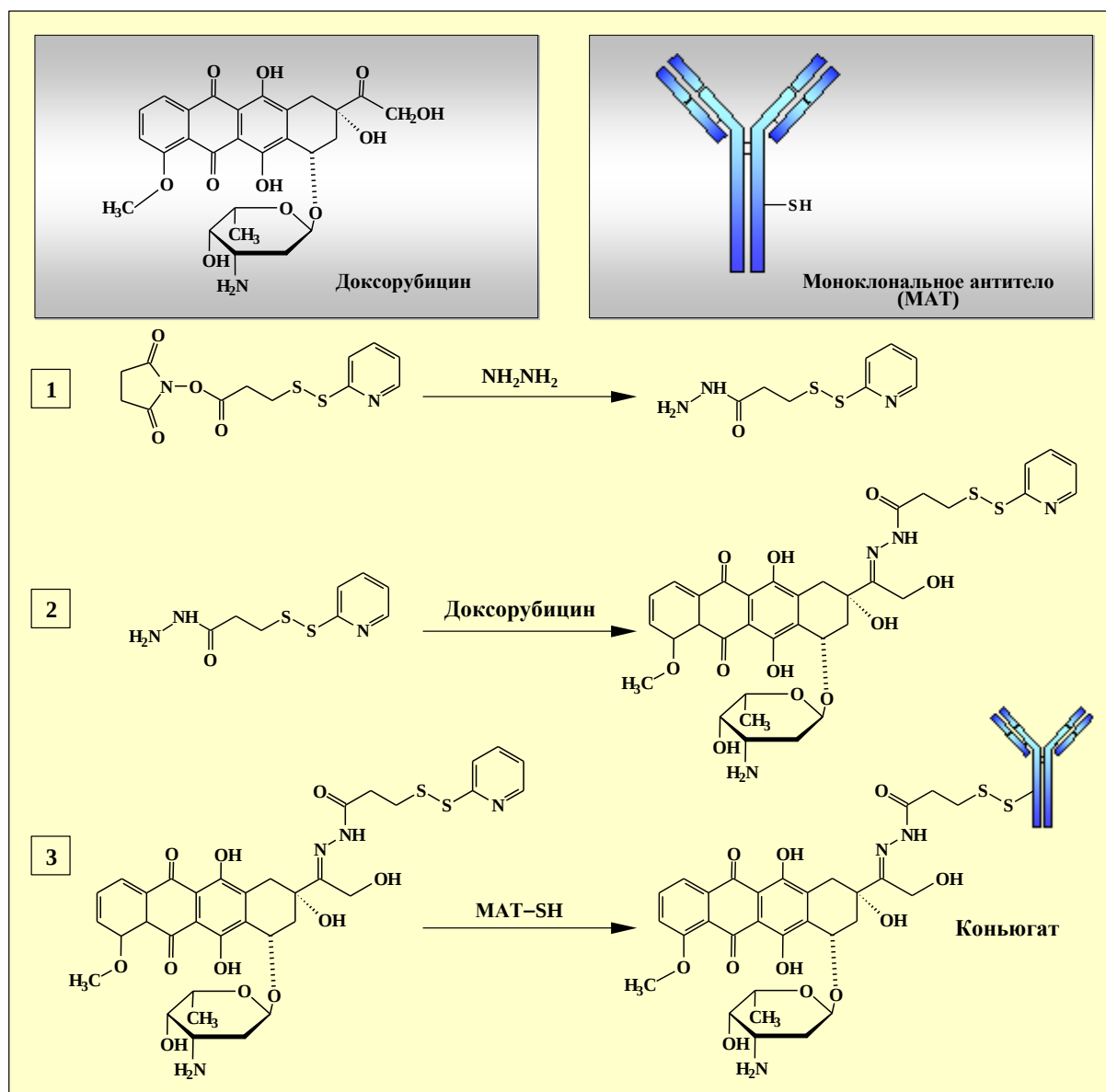


Рис. 81. Схематическое изображение этапов одного из методов синтеза конъюгата антител с антрациклиновым антибиотиком доксорубицином. 1. Модификация гетеробифункционального кросс-линкера SPDP. 2. Активация доксорубицина с помощью модифицированного SPDP. 3. Получение конъюгата доксорубицина с антителом.

Разрешенный к применению для терапии онкологических заболеваний препарат «Gemtuzumab ozogamicin» (коммерческое название Mylotarg®) включает конъюгат гуманизированных антител против антигена CD33 с антибиотиком ендиинового ряда

калихемицином, продуцируемым актиномицетами (лучистыми грибами) *Micromonospora echinospora*. Связывание антитела с антигеном CD33, локализованным на поверхности опухолевой клетки, индуцирует интернализацию, в ходе которой конъюгат оказывается в клетке. В процессе внутриклеточной сортировки антибиотик отщепляется от антитела, проникает в ядро и нарушает целостность ДНК, что приводит к гибели опухолевой клетки [49]. Препарат «Gemtuzumab ozogamicin» применяется для терапии острой миелоидной CD33-позитивной лейкемии у пациентов пожилого возраста. Клинические исследования показали также, что препарат «Gemtuzumab ozogamicin» может применяться в комбинации с флударабином и мелфаланом, а также аллогенной трансплантацией костного мозга для лечения острого миелобластного лейкоза.

Таблица 3. Препараты на основе свободных антител

Название	Природа антител	Область применения	Статус	Ссылка
Rituximab (Rituxan®)	Химерные антитела к CD20	В-клеточная лимфома	Препарат (1997)	[140]
Trastuzumab (Herceptin®)	Гуманизированные антитела к рецептору ЭФР (HER2)	Рак молочной железы	Препарат (1998)	[2]
Alemtuzumab (Campath-1H)	Гуманизированные антитела к CD52	Хроническая лимфоцитарная лейкемия	Препарат (2001)	[288]
Cetuximab (Erbix®)	Химерные (человек-мышь) антитела к рецептору ЭФР	Колоректальный рак, рак головы и шеи	Препарат (2004)	[222]
Bevacizumab (Avastin®)	Химерные антитела к VEGF	Колоректальный рак	Препарат (2004)	[89]
Nimotuzumab (h-R3)	Гуманизированные антитела к рецептору ЭФР	Глиомы, карцинома, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак	Клинические испытания I-II фаза	[267]
Panitumumab (Vectibix®)	Человеческие антитела к рецептору ЭФР	Немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак	Клинические испытания I-II фаза	[267]
Matuzumab (EMD-72000)	Гуманизированные антитела к рецептору ЭФР	Колоректальный рак	Клинические испытания III фаза	[267]
Pertuzumab (Omnitarg®)	Гуманизированные антитела к рецептору ЭФР (HER2)	Рак молочной железы, простаты, яичника	Клинические испытания III фаза	[302]
Vitaxin	Гуманизированные антитела к интегрину $\alpha V\beta 3$	Меланома, рак простаты	Клинические испытания I-II фаза	[117]
Apolizumab	Человеческие антитела к антигену поверхности Т-лейкоцитов HLA-DR	Хроническая лимфоцитарная лейкемия	Клинические испытания II фаза	[183]
Zanolimumab (HuMax-CD4)	Человеческие антитела к CD4	Кожная Т-клеточная лимфома	Клинические испытания III фаза	[302]

Антитела не только в составе препаратов направленного действия, но и сами по себе могут избирательно связываться с опухолевыми антигенами и вызывать подавление роста и гибель опухолевых клеток. На основании этой способности антител был разработан ряд противоопухолевых препаратов (табл. 3).

Препарат «Rituximab» (коммерческие названия MabThera®, Rituxan®) содержит

химерные моноклональные антитела с переменными участками последовательности мышино-человеческого происхождения и человеческими константными участками (табл. 3). Эти антитела избирательно связываются с антигеном CD20, локализованным на поверхности В-клеток, и вызывают иммунологические реакции, опосредующие лизис В-клеток [140]. «Rituximab» зарегистрирован в США в 1997 г. как препарат для лечения В-клеточных вялотекущих неходжкинских лимфом. В 2006 г. препарат разрешен к применению для лечения диффузных CD20-позитивных В-крупноклеточных лимфом и ревматоидного артрита.

Препарат «Alemtuzumab» (коммерческое название «Campath-1H») содержит гуманизированные моноклональные антитела к антигену CD52, широко (500 тыс. молекул на клетку) представленному на поверхности В- и Т-лимфоцитов (табл. 3). В этих гуманизированных антителах лишь небольшие участки связывания с антигеном имеют крысиное происхождение. Препарат применяется для лечения хронического лимфолейкоза. При действии на опухолевую клетку переменный участок молекулы антитела связывается с антигеном CD52, а Fc-фрагмент – с Fc-рецепторами, локализованными на поверхности цитотоксических клеток, которые в результате активации индуцируют лизис опухолевой клетки. Антитела, входящие в состав препарата, также активируют систему комплемента, что вызывает формирование белкового цитотоксического комплекса, разрушающего мембрану опухолевой клетки. Гуманизированные антитела к CD52 были получены в Кембриджском университете в Англии, и в 2001 г. препарат был разрешен для лечения хронического лимфолейкоза [288].

Препарат «Bevacizumab» (коммерческое название Avastin®) содержит гуманизированные моноклональные антитела и обладает цитостатическим и цитотоксическим действием (табл. 3). Механизм действия препарата заключается в связывании антителами фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), результатом которого является подавление развития опухолевой кровеносной сети и индукция апоптотической гибели эндотелиальных клеток. Благодаря антиангиогенному действию препарат значительно усиливает эффект различных химиопрепаратов. «Bevacizumab» был зарегистрирован в США в 2004 г. в качестве противоопухолевого препарата, применяемого в комбинации с фторурацилом для терапии метастатического колоректального рака [89].

Препарат «Cetuximab» (коммерческое название Erbitux®) включает моноклональные химерные антитела против рецептора эпидермального фактора роста (табл. 3). Блокирование связывания ЭФР с рецептором вызывает подавление опухолевого роста и индуцирует апоптотическую гибель опухолевых клеток [222]. В 2003 г. «Cetuximab» зарегистрирован в США как препарат для терапии рака толстой кишки, проводимой в комбинации с химиопрепаратом иринотеканом. В 2006 г. препарат «Cetuximab» был разрешен для лечения рака головы и шеи.

Препарат «Trastuzumab» (коммерческое название Herceptin®) содержит рекомбинантные гуманизированные мышинные моноклональные антитела, которые, связываясь с внеклеточным доменом рецептора ЭФР 2 типа (c-erbB2, или ErbB2, или HER2), блокируют лиганд-рецепторные взаимодействия на поверхности опухолевых клеток

Таблица 4. Конъюгаты моноклональных антител и их фрагментов с радионуклидами (радиоиммуноконъюгаты)

Название	Природа антител	Активное вещество	Область применения	Статус	Ссылка
Satumomab pendetide (OncoScint)	Мышиные антитела к ассоциированному с опухолью антигену TAG-72	Индий-111	Колоректальный рак, рак яичника	Препарат (1992)	[322]
Nofetumomab merpentan (Verluma)	Fab'-фрагменты мышиных антител к эпителиальному антигену EGP-1	Технеций-99m	Мелкоклеточный рак легкого	Препарат (1996) (в настоящее время не применяется)	[29]
Arcitumomab (CEA-Scan)	Fab'-фрагменты мышиных антител к опухолевому эмбриональному антигену CEA	Технеций-99m	Колоректальный рак	Препарат (1996) (в настоящее время не применяется)	[109]
Capromab pendetide (ProstaScint)	Мышиные антитела к простатоспецифическому мембранному антигену (PSMA)	Индий-111	Рак простаты	Препарат (1996)	[162]
Ibritumomab tiuxetan (Zevalin®)	Антитела к CD20	Иттрий-90	Неходжкинские лимфомы	Препарат (2002)	[85]
Tositumomab (Bexxar®)	Антитела к CD20	Иод-131	Неходжкинские лимфомы	Препарат (2003)	[149]

(табл. 3). «Trastuzumab» подавляет пролиферацию опухолевых клеток и применяется для лечения больных метастазирующим раком молочной железы с опухолевой гиперэкспрессией рецептора ЭФР. Лечение проводят в виде монотерапии после проведения химиотерапии или в комбинации с паклитакселом (таксолом) [2].

Несмотря на интенсивные поиски средств избирательной доставки радионуклидов к опухолям, в настоящее время в клинике применяются лишь два подобных препарата (табл. 4). Препарат «Ibritumomab tiuxetan» (коммерческое название Zevalin®) содержит несущие изотоп иттрия ^{90}Y моноклональные антитела, направленные против локализованного на поверхности В-клеток антигена CD20 [85]. Изотоп ^{90}Y испускает β -излучение, проникающее на глубину до 10 мм, поэтому его повреждающее действие на нормальные ткани минимально и препарат может применяться без госпитализации в амбулаторных условиях. Препарат «Ibritumomab tiuxetan» применяют для лечения рецидивов и рефрактерных форм фолликулярных лимфом.

Препарат «Tositumomab» (коммерческое название Bexxar®) содержит мышиные моноклональные антитела против антигена CD20, несущие изотоп иода ^{131}I , период полураспада которого составляет 8 сут. Поскольку радиоактивный распад изотопа ^{131}I сопровождается проникающим β - и γ -излучением, лечение проводят в условиях специального стационара. Препарат «Tositumomab» применяется для лечения рецидивов фолликулярных лимфом [149].

Препараты на основе белков

В конъюгатах с химиопрепаратами в качестве векторных молекул помимо антител активно используются различные белки и их пептидные фрагменты (табл. 5). В настоящее

Таблица 5. Конъюгаты векторных белков и их фрагментов с терапевтическими агентами

Белок	Терапевтический агент	Область применения	Статус	Ссылка
Альбумин	Паклитаксел (таксол)	Метастазирующий рак молочной железы, немелкоклеточный рак легкого	Препарат Abraxane® (ABI-007)	[128]
Альбумин–лактозамин	Аденин арабинозид монофосфат (блокатор ДНК-полимеразы)	Вирусный гепатит В	Клинические испытания	[339, 388]
Альфа-фетопrotein (АФП) Эпидермальный фактор роста (ЭФР)	Калихемицин, эсперамицин	Т- и В-клеточные лимфомы, карцинома молочной железы, карцинома яичника	Лабораторные испытания	[299, 402]
АФП, ЭФР	Винкристин, винбластин	Лейкозы, карцинома молочной железы, меланома	Лабораторные испытания	[299, 407]
АФП, ЭФР	Доксорубицин, карминомицин	Карциномы молочной железы и яичника, резистентные к антрациклинам; Т-клеточная лимфома, меланома	Лабораторные испытания	[88, 191]
АФП, ЭФР	Фталоцианины (алюминия, кобальта), окта-4,5-карбоксифталоцианин (терафтал), хлорины	Карциномы, лимфомы, меланома	Лабораторные испытания	[192, 286, 401]
Рецепторсвязывающий пептидный фрагмент ЭФР	Доксорубицин	Опухолевые и пролиферирующие эндотелиальные клетки человека и мыши	Лабораторные испытания	[190]
Рецепторсвязывающий пептидный фрагмент ТФР α	Доксорубицин	Карцинома молочной железы, предстательной железы, яичника, фибросаркома	Лабораторные испытания	[396]
Трансферрин	Митомицин С	Гепатомы	Лабораторные испытания	[327, 328]
Трансферрин	Гематопорфирин	Лейкемия (фотодинамическая терапия)	Лабораторные испытания	[179]
Трансферрин	Инсулин	Диабет	Лабораторные испытания	[378]
Ангиостатин	Доксорубицин	Васкуляризированные опухоли	Лабораторные испытания	[397, 398]

время получены и активно исследуются конъюгаты эпидермального фактора роста, альфа-фетопропротеина, альбумина, трансферрина и их пептидных фрагментов с различными химиопрепаратами (табл. 5). Также получен конъюгат антиангиогенного белка ангиостатина с противоопухолевым химиопрепаратом доксорубицином (табл. 5). Препарат Abraxane®, основой которого является конъюгат альбумина с таксолом, уже разрешен для клинического применения при терапии рака легкого и молочной железы [128]. В настоящее время проходит доклинические и клинические испытания ряд препаратов направленного действия, в которых в качестве терапевтических агентов выступают растительные и бактериальные токсины (табл. 6), однако пока для медицинского применения разрешен лишь препарат, получивший название «Denileukin Diftitox» (др. название DAB₃₈₉IL2, коммерческое –

Таблица 6. Конъюгаты векторных белков с токсинами

Белок	Токсин	Область применения	Статус	Ссылка
ХИМИЧЕСКИЕ				
Трансферрин	CRM107 (мутантный дифтерийный токсин)	Глиобластома, астроцитома	Клинические испытания	[180, 181]
РЕКОМБИНАНТНЫЕ				
IL-2	Фрагмент дифтерийного токсина DAB ₃₈₉	Кожная Т-клеточная лимфома, хроническая лимфоцитарная лейкемия, неходжкинская лимфома	Препарат ONTAK® (Denileukin Diftitox)	[63, 94, 97]
EGF	Фрагмент дифтерийного токсина DAB ₃₈₉	Карцинома	Клинические испытания	[95]
GM-CSF	Фрагмент дифтерийного токсина DT ₃₈₈	Острая миелоидная лейкемия	Клинические испытания	[99]
TGFα	Фрагмент псевдомонадного экзотоксина PE38	Глиобластома	Клинические испытания	[280]
TGFα	PE40 ^{4a} (мутантный фрагмент псевдомонадного экзотоксина PE40)	Рак мочевого пузыря, карцинома in situ	Лабораторные испытания	[108]
IL-4	PE38KDEL (мутантный фрагмент псевдомонадного экзотоксина PE38)	Опухоли мозга и ЦНС, рак почки, молочной железы, немелкоклеточный рак легкого	Клинические испытания	[259, 367]
IL-13	PE38QQR (мутантный фрагмент псевдомонадного экзотоксина PE38)	Глиома	Клинические испытания	[133, 172, 254]
<i>Сокращения: IL-2, -4, -13 – интерлейкин-2, -4, -13; EGF – эпидермальный фактор роста; GM-CSF – фактор, стимулирующий колонии гранулоцитов–макрофагов; TGFα – трансформирующий фактор роста α.</i>				

ONTAK®), активный компонент которого представляет собой гибридный белок, получаемый генно-инженерными методами в результате «слияния» аминокислотных последовательностей дифтерийного токсина и фактора роста Т-клеток интерлейкина-2 [63, 94, 97]. Гибридный белок связывается с рецептором интерлейкина-2 белком CD25, представленным на поверхности Т-супрессоров, и попадает в клетку путем рецепторопосредованного эндоцитоза. В ходе компартментализации токсический компонент отщепляется, попадает в цитоплазму и блокирует биосинтез клеточных белков, вызывая апоптотическую гибель Т-супрессоров. В результате цитотоксические Т-клетки могут беспрепятственно атаковать и уничтожать опухолевые клетки. С помощью препарата «Denileukin Diftitox» лечат кожные Т-клеточные лимфомы. Клинические испытания препарата показали, что он также может применяться против меланомы. Противоопухолевые препараты на основе антител и векторных белков отличаются высокой избирательностью действия и низкой токсичностью для нормальных клеток организма. Следует ожидать, что в недалеком будущем такие препараты найдут широкое применение в практической онкологии и других областях медицины.

Таким образом, несмотря на наличие на фармацевтическом рынке сравнительно небольшого числа препаратов, основу которых составляют антитела, разработка новых препаратов этого класса продолжает оставаться актуальной, а перспективы их эффективного применения – весьма обнадеживающими. К факторам, ограничивающим применение антител, относятся: сложность технологий и высокая стоимость производства (особенно гуманизированных антител); невозможность перорального применения; иммуногенность (особенно при применении в составе препаратов направленного действия); недостаточно высокая эффективность интернализации; присутствие антигенов не только на поверхности клеток-мишеней, но и поверхности здоровых тканей и т.д. Несмотря на перечисленные ограничивающие факторы и некоторые недостатки, антитела отличаются высокой избирательностью действия и низкой токсичностью и как в виде полноразмерных молекул, так и их фрагментов широко применяются в различных аналитических и диагностических системах. Антитела и их фрагменты также находят применение в качестве средств терапии различных патологий и векторных компонентов препаратов направленного действия, «нацеленных» липосом и наночастиц. Уникальные свойства и широкие возможности практического применения антител вызывают неослабевающий интерес исследователей к разработке на их основе все новых технологий, диагностических систем и лекарственных препаратов.

Причины низкой эффективности действия иммуноконъюгатов

Отсутствие противоопухолевого эффекта, наблюдавшееся в ряде случаев при испытаниях конъюгатов антител с химиопрепаратами на больных, указывает на то, что конъюгаты не обеспечивали необходимых для проявления терапевтического эффекта уровней накопления препаратов в опухолевой ткани. Это подтвердили исследования, в которых с помощью радиоактивно меченых антител было продемонстрировано, что в опухолевой ткани накапливалось слишком мало препарата (0,003-0,080% от введенной дозы) [297].

Наблюдаемую в некоторых случаях невозможность воспроизвести на больных людях полученные в опытах с мышами многообещающие результаты можно объяснить тем, что мышам вводились дозы, которые были в 20 раз выше переносимых людьми. При этом у мышей в опухолях накапливалось значительно больше конъюгата, чем у людей (до 20% от введенной дозы). Существуют и другие возможные причины низкой эффективности действия иммуноконъюгатов:

- низкая эффективность проникновения иммуноконъюгатов в опухоли (крупные молекулы, подобные иммуноглобулинам, практически не проникают в плохо васкуляризированные опухоли);
- низкий уровень экспрессии антигенов на поверхности опухолевых клеток (менее 10^4 молекул на клетку);
- недостаточная эффективность интернализации лиганд-рецепторных комплексов

(эффективность интернализации антител бывает различной, а внутриклеточная концентрация терапевтического агента непосредственно зависит от интернализации);

- низкая стабильность конъюгата (в идеальном случае терапевтический агент должен быть присоединен таким образом, чтобы его связь с антителом была стабильной в течение длительного времени при хранении и циркуляции в кровяном русле). Высвобождение терапевтического агента должно происходить внутри клетки-мишени после связывания конъюгата с антигеном, интернализации и компартментализации лиганд-рецепторных комплексов. Преждевременный распад или расщепление конъюгата приводит к резкому снижению избирательности и эффективности его действия;
- низкая эффективность высвобождения терапевтического агента из состава конъюгата в клетке (терапевтический агент может оказаться «запертым» в эндосомном или лизосомном компартментах);
- недостаточная цитотоксическая активность (противоопухолевые химиопрепараты, подобные метотрексату и доксорубину, имеют умеренную цитотоксичность, так что для гибели клетки необходима интернализация большого числа молекул цитотоксика);
- снижение токсичности терапевтического агента при конъюгировании (химические модификации молекулы терапевтического агента могут затрагивать группировки атомов, участвующие в проявлении цитотоксических эффектов, что приводит к инактивации конъюгатов);
- иммунные реакции организма на препарат (первые конъюгаты были получены на основе мышинных антител, вызывавших у человека продукцию антимышинных антител, что приводило к быстрому связыванию и выведению конъюгата из кровотока).

Таким образом, существует множество факторов, влияющих на терапевтическую активность препаратов направленного действия. Учет этих факторов при разработке и применении препаратов является необходимым условием достижения максимального терапевтического эффекта.

Несмотря на ряд неудачных попыток применения антител в качестве векторов для направленной доставки химиопрепаратов, по-прежнему проявляется большой интерес исследователей к противоопухолевым препаратам, включающим моноклональные антитела или их конъюгаты с терапевтическими агентами. Как уже отмечалось, в последние несколько лет было разрешено к применению несколько новых лекарств на основе моноклональных антител, а еще большее их число проходит расширенные клинические испытания.

НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ

Транспортные наночастицы и переносчики терапевтических агентов

Одним из перспективных направлений нанобиотехнологии является разработка наноразмерных носителей, способных доставлять противоопухолевые химиопрепараты, токсины и радионуклиды в клетки-мишени. При разработке подобных носителей важно учитывать, каким образом будет достигаться преимущественное накопление химиопрепарата именно в опухолевой ткани. Существуют два основных пути обеспечения такого накопления – пассивное и активное «нацеливание». При пассивном нацеливании препарат (например, наночастицы, несущие бактериальный токсин) при введении в кровь преимущественно накапливается в опухолевой ткани благодаря биологическим особенностям опухоли – повышенной проницаемости мембран опухолевых клеток и опухолевых кровеносных сосудов, отсутствию активной лимфодренажной системы (препарат удерживается в опухоли), высокому уровню метаболической активности опухолевых клеток, активному пиноцитозу и др. Повышенная проницаемость опухолевых кровеносных сосудов позволяет проникать в опухоль липосомным наночастицам диаметром до 400 нм, однако максимальной проникающей способностью обладают частицы диаметром менее 200 нм. При разработке дизайна наночастиц следует учитывать, что проницаемость сосудов различных типов опухолей может существенно варьировать. Кроме того, опухоль отличается неравномерной васкуляризацией – ее периферия сильно васкуляризирована, а центральная область практически лишена сосудов. Впервые наночастицы (липосомы и конъюгаты белков с полимерами), доставляемые в опухолевую ткань путем пассивного нацеливания, появились на фармацевтическом рынке еще во второй половине прошлого столетия. Позднее был получен ряд усовершенствованных наночастиц подобного рода. Для активного нацеливания на опухолевую ткань создается конструкция, включающая наночастицу, нагруженную химиопрепаратом и связанную с ней векторную молекулу, способную распознавать и взаимодействовать с антигенами или рецепторами, специфично представленными на поверхности опухолевых клеток. После связывания векторной молекулы с рецептором инициируется процесс рецепторопосредованного эндоцитоза, в ходе которого вся конструкция оказывается в клетке, где токсический агент высвобождается из состава наночастицы и поражает опухолевую клетку.

Независимо от типа нацеливания, применение наночастиц для терапии онкологических заболеваний имеет ряд преимуществ по сравнению со свободными химиопрепаратами. Применение наночастиц позволяет добиваться более избирательного и эффективного поступления химиопрепарата в клетку-мишень, защищать его от преждевременной деградации и ограждать от проникновения в здоровые ткани. Кроме того, посредством манипулирования строением, составом, размером и степенью загруженности наночастиц можно осуществлять контроль фармакокинетики и профиля тканевого распределения химиопрепарата. Нанотехнологии позволяют также регулировать скорость высвобождения химиопрепарата, включенного в состав наночастиц.

Таблица 7. Конъюгаты химиопрепаратов, терапевтических белков и олигонуклеотидов с полимерами

Название	Полимер	Активное вещество	Область применения	Статус	Ссылка
КОНЬЮГАТЫ ПОЛИМЕР–ХИМИОПРЕПАРАТ					
AP5346 (ProLindac)	Поли-N-(2-гидроксипропил)-метакриламид (HPMA)	Диаминоциклогексан платинат	Рак	Препарат	[36]
AP5280	— // —	Карбоплатин	Рак	Клинические испытания II фаза	[258]
PNU166945	— // —	Паклитаксел (таксол)	Рак	Клинические испытания I фаза	[205]
CT-2106	Поли-L-глутамат	Камптотецин	Рак	Клинические испытания I фаза	[311]
CT-2103 (XYOTAX®)	— // —	Паклитаксел (таксол)	Рак легкого, рак яичника, рак пищевода	Клинические испытания II-III фаза	[177]
PK1, FCE28068	Поли-N-(2-гидроксипропил)-метакриламид (HPMA)–галактозамин	Доксорубицин	Рак прямой кишки, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы (в т.ч. резистентный к антрациклинам), рак яичника	Клинические испытания I-II фаза	[356]
PK2, FCE28069	— // —	Доксорубицин	Гепатоклеточная карцинома	Клинические испытания I-II фаза	[300]
PNU166148 (Mureletecan)	Сополимер N-(2-гидроксипропил)-метакриламида (HPMA) с метакрилоил-глицинамидом	Камптотецин	Рак	Клинические испытания I фаза	[283]
Prothecan®	Полиэтиленгликоль	Камптотецин	Рак	Клинические испытания II фаза	[275]

Для достижения максимальной терапевтической эффективности наночастицы должны отвечать ряду требований: состоять из биосовместимого и, желательно, биodeградебельного материала; обладать высокой гидрофильностью и способностью образовывать устойчивые водные дисперсии; обладать свойствами преимущественного накопления в ткани-мишени; характеризоваться низкой скоростью агрегации и длительным периодом циркуляции в кровотоке.

Наноразмерные носители лекарственных препаратов обычно представляют собой наночастицы, размеры которых в каждом из трех измерений не превышают 1000 нм. Такие наночастицы могут связывать или включать в свой состав различные терапевтические агенты и высвобождать их в определенных тканях-мишенях. Благодаря высокому отношению площади поверхности к объему наночастицы могут нести большое количество

Таблица 7 (продолжение). Конъюгаты химиопрепаратов, терапевтических белков и олигонуклеотидов с полимерами

Название	Полимер	Активное вещество	Область применения	Статус	Ссылка
КОНЬЮГАТЫ ПОЛИМЕР-БЕЛОК					
SMANCS (Zinostatin Stimalmer®)	Сополимер стирола с maleиновой кислотой	Неокарциностаин	Гепатоклеточная карцинома	Препарат (1993)	[1]
Oncaspar®	Линейный монометокси-ПЭГ	L-аспарагиназа	Острая лимфобластная лейкемия	Препарат (1994)	[116]
Neulasta™	Линейный монометокси-ПЭГ (мол. масса 20 кДа)	Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF)	Нейтропения, связанная с химиотерапией рака	Препарат (2002)	[213]
Adagen®	Линейный ПЭГ	Аденозиндезаминаза	Тяжелый комбинированный иммунодефицит	Препарат (1990)	[66]
PEG-Asys®	Разветвленный монометокси-ПЭГ (мол. масса 40 кДа)	Альфа-интерферон-2a	Гепатит В и С, меланома, хроническая миелоидная лейкемия, почечноклеточная карцинома	Препарат (2002)	[264]
PEG-Intron™	Линейный монометокси-ПЭГ (мол. масса 12 кДа)	Альфа-интерферон-2b	Гепатит С, рак, множественный склероз, СПИД	Препарат (2000)	[366]
Pegvisomant®	Линейный ПЭГ (мол. масса 5 кДа)	Гормон роста человека	Акромегалия	Препарат (2002)	[274]
CDP870 (Certolizumab pegol)	Линейный ПЭГ	Fab-фрагмент антител к фактору некроза опухоли (TNF)	Ревматоидный артрит, болезнь Крона	Клинические испытания	[74]
КОНЬЮГАТЫ ПОЛИМЕР-ОЛИГОНУКЛЕОТИД					
Pegaptanib sodium (Macugen®)	Разветвленный ПЭГ (мол. масса 40 кДа)	Аптамер (последовательность из 26 рибонуклеотидов, обладающая активностью ингибитора VEGF)	Возрастная макулярная дегенерация	Препарат (2004)	[257]

химиопрепарата или связанного с их поверхностью векторного компонента. Для получения наночастиц чаще всего используют природные и синтетические полимеры, соли и оксиды металлов, углерод, кремний, различные липиды и др. В качестве наноносителей терапевтических препаратов могут выступать антитела и белки, линейные и разветвленные полимеры, дендримеры, полимерные мицеллы и наночастицы, липидные наночастицы (липосомы, мицеллы, обращенные мицеллы и т.д.), углеродные нанотрубки, металлические и металлокерамические наночастицы и др. (рис. 1).

В настоящее время разработано большое количество разнообразных технологий получения наночастиц и конъюгатов химиопрепаратов с их носителями – антителами, векторными белками и синтетическими полимерами. При конъюгировании химиопрепаратов

и белков с синтетическими полимерами широко применяются полиэтиленгликоли (ПЭГ), поли-L-глутаминовая кислота, декстраны, N-(2-гидроксипропил)метакриламид и др. (табл. 7) [75, 361].

Применение полиэтиленгликолей в нанотехнологии и медицине

ПЭГ обладают рядом уникальных свойств, позволяющих широко применять их для модификации белков и наночастиц. Химическое присоединение ПЭГ к белкам (наночастицам и ряду других молекул) может приводить к повышению их растворимости в биологических жидкостях, увеличению биодоступности и времени циркуляции в кровотоке, снижению иммуногенности. Кроме того, пэгиллированные молекулы белка приобретают защиту от протеолитического расщепления, образования высокомолекулярных комплексов, поглощения макрофагами или инактивации иммуноглобулинами в кровотоке. Помимо ковалентных модификаций белков и других терапевтически активных агентов, ПЭГ может также использоваться для получения нековалентных комплексов с этими агентами. Взаимодействие ПЭГ с плохо растворимыми веществами может приводить к значительному увеличению их растворимости и биодоступности.

Линейная цепь ПЭГ состоит из повторяющихся этиленоксидных звеньев; каждый конец молекулы ПЭГ содержит по гидроксильной группе (рис. 82). Молекулярная масса производимых в настоящее время ПЭГ может колебаться в широких пределах от 200 до 40 000 Да и выше, причем молекулы полимера могут формировать как линейную, так и разветвленную структуру. Для конъюгирования чаще используют хорошо растворимые в воде и различных органических растворителях полиэтиленгликоли с мол. массой ниже 20 000 Да. ПЭГ проявляют амфифильные свойства, растворяясь как в водных, так и органических растворах и липидных мембранах. Для конъюгирования с другими молекулами обычно используют концевые гидроксильные группы ПЭГ. Предотвращения полимеризации цепей ПЭГ при активации гидроксильных групп добиваются путем использования метилированного производного ПЭГ, каждая цепь которого содержит лишь одну гидроксильную группу (монометоксиполиэтиленгликоль, мПЭГ). Применение бифункциональных кросс-линкеров позволяет получать конъюгаты ПЭГ с различными белковыми и небелковыми молекулами (рис. 82). На основе ПЭГ создан ряд противоопухолевых препаратов, которые успешно применяются в клинической практике (табл. 7).

Как указывалось выше, химическое присоединение ПЭГ к белкам и наночастицам, предназначенным для терапии, во многих случаях приводит к увеличению времени их циркуляции в крови, снижению токсичности и иммуногенности, повышению устойчивости и терапевтической активности. Новые свойства модифицированных ПЭГ белков во многом определяются длиной полимера, степенью разветвленности его структуры, а также местоположением сайтов, по которым производится модификация. Например, при использовании более длинных или более разветвленных цепей ПЭГ наблюдается увеличение

стабильности и времени циркуляции модифицированного белка в крови, а также снижение его иммуногенности. В силу высокой гидрофильности цепей ПЭГ на поверхности модифицированной молекулы (или наночастицы) формируется гидратная оболочка с высоким гидродинамическим радиусом. Эта гидратная оболочка значительно повышает стабильность, растворимость и биодоступность заключенного в нее вещества, а также защищает его от нейтрализующих антител, опсонизации и последующего поглощения макрофагами. В настоящее время ПЭГ активно применяются в производстве лекарств, медицине, пищевой промышленности и косметологии. Помимо использования для модификации белков и наночастиц, ПЭГ могут применяться и как самостоятельные терапевтические агенты. Так, биологически инертный, нетоксичный, практически не всасывающийся в желудочно-кишечном тракте ПЭГ 3350, действующий в качестве осмотического агента, увеличивает содержание воды в каловых массах и может применяться в виде слабительного средства.

Химическая структура ПЭГ приведена на рис. 82. Полиэтиленгликоли представляют собой жидкие или твердые полимерные продукты общей формулы $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, где $n \geq 4$. Низкомолекулярные ПЭГ представляют собой жидкости, а высокомолекулярные – твердые вещества. Например, ПЭГ 400 представляет собой вязкую гигроскопическую жидкость, а ПЭГ 4000 – белый порошок. Полиэтиленгликоли низкотоксичны, не разлагаются и не гидролизуются при хранении, подавляют рост плесневых грибов. Двухатомный спирт этиленгликоль представляет собой бесцветную или желтоватую жидкость. Этиленгликоль хорошо растворим в этаноле, ацетоне и воде и применяется в качестве пластификатора в производстве целлофана и различных синтетических волокон. Также этиленгликоль применяется в качестве растворителя красок и компонента различных технических жидкостей. Водные растворы этиленгликоля обладают низкими (до -65°C) температурами замерзания, что обуславливает его применение в антифризах и тормозных жидкостях. В отличие от ПЭГ этиленгликоль токсичен (LD_{50} для мышей составляет 8 г/кг веса животного) и способен проникать в организм человека через кожу.

Для модификации белков и различных терапевтических агентов, а также применения в составе лекарственных средств в основном используются ПЭГ с мол. массами 400, 3000, 3350, 4000, 6000 и 8000 Да. При пероральном применении степень абсорбции полимеров ПЭГ зависит от их молекулярной массы. Так, низкомолекулярные ПЭГ хорошо абсорбируются в желудочно-кишечном тракте (до 60% от применяемой дозы), тогда как высокомолекулярные ПЭГ практически не абсорбируются. В экспериментах на крысах было продемонстрировано, что при пероральном применении ПЭГ 4000 и ПЭГ 6000 практически не всасываются в кишечнике, а ПЭГ 1000 всасывается незначительно (около 2% за 5 ч).

При введении низкомолекулярных ПЭГ в кровь наблюдается неполное их выведение через почки, однако в организме ПЭГ подвергаются постепенному метаболическому окислению до карбоновых кислот и, по-видимому, полностью выводятся из организма. После внутривенного введения человеку ПЭГ 400 через 12 ч с мочой выводится лишь 75% полимера. В первые 24 ч выводится около 85% полимера, и полное выведение наблюдается

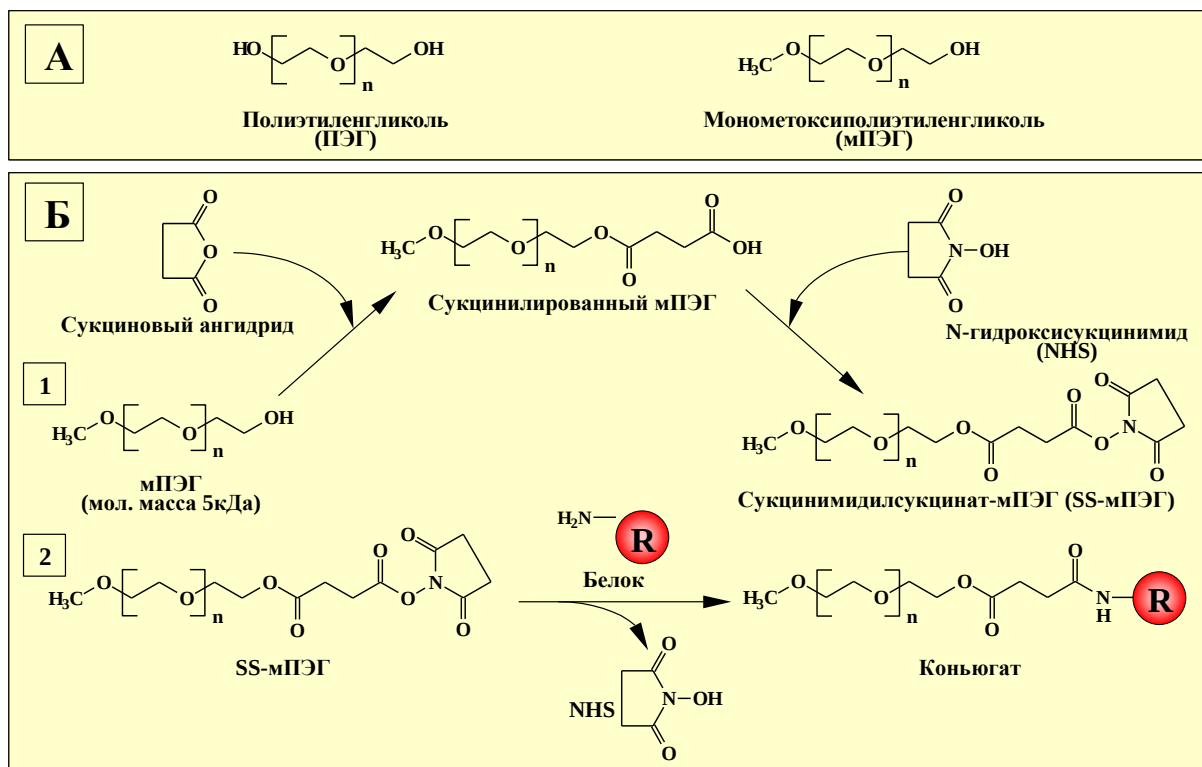


Рис. 82. Химическая структура полиэтиленгликоля и монометоксиполиэтиленгликоля (мПЭГ), а также схематические изображения реакций получения конъюгатов мПЭГ с белками. **А.** Полиэтиленгликоли представляют собой жидкие или твердые полимерные продукты общей формулы $\text{H}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, где $n \geq 4$. На одном из концов молекулы мПЭГ несет метильную группу, препятствующую образованию «перешитых» олигомерных комплексов белков при конъюгировании. **Б.** мПЭГ может быть активирован с помощью сукцинового ангидрида. Затем в органическом растворителе проводят реакцию сукцинированного мПЭГ с N-гидроксисукцинимидом в присутствии карбодиимида, в результате которой получают производное сукцинимидилсукцинат-мПЭГ (SS-мПЭГ) (1), которое используют для модификации белков и других молекул, содержащих аминогруппы (2). В результате получают конъюгаты, стабилизированные амидной связью, тогда как эфирная связь в сукцинированном мПЭГ подвержена гидролизу.

через 5-7 суток. После внутривенного введения человеку ПЭГ 1000 и ПЭГ 6000 (по 1 г) через 12 ч из организма с мочой выводится 85% и 96% полимера, соответственно. При пероральном применении ПЭГ 400 у людей более 90% от принятой дозы (10 г) выводится из организма через почки в течение 4-х дней. Полиэтиленгликоли или их метаболиты могут удаляться из организма посредством гломерулярной фильтрации в мочу или путем секреции в желчь с последующим выведением с экскрементами.

Как уже отмечалось, ПЭГ проявляют низкую токсичность, которая тем ниже, чем выше молекулярная масса полимера. При этом даже низкомолекулярные ПЭГ (мол. массы от 200 до 9000 Да) практически нетоксичны (LD_{50} для мышей составляет более 30 г/кг веса тела). При пероральном применении ПЭГ 200 (4 мл) на крысах в течение 3 месяцев каких либо патологических изменений не наблюдалось. Острая токсичность ПЭГ 6000, определенная в экспериментах на крысах при пероральном и интраперитонеальном

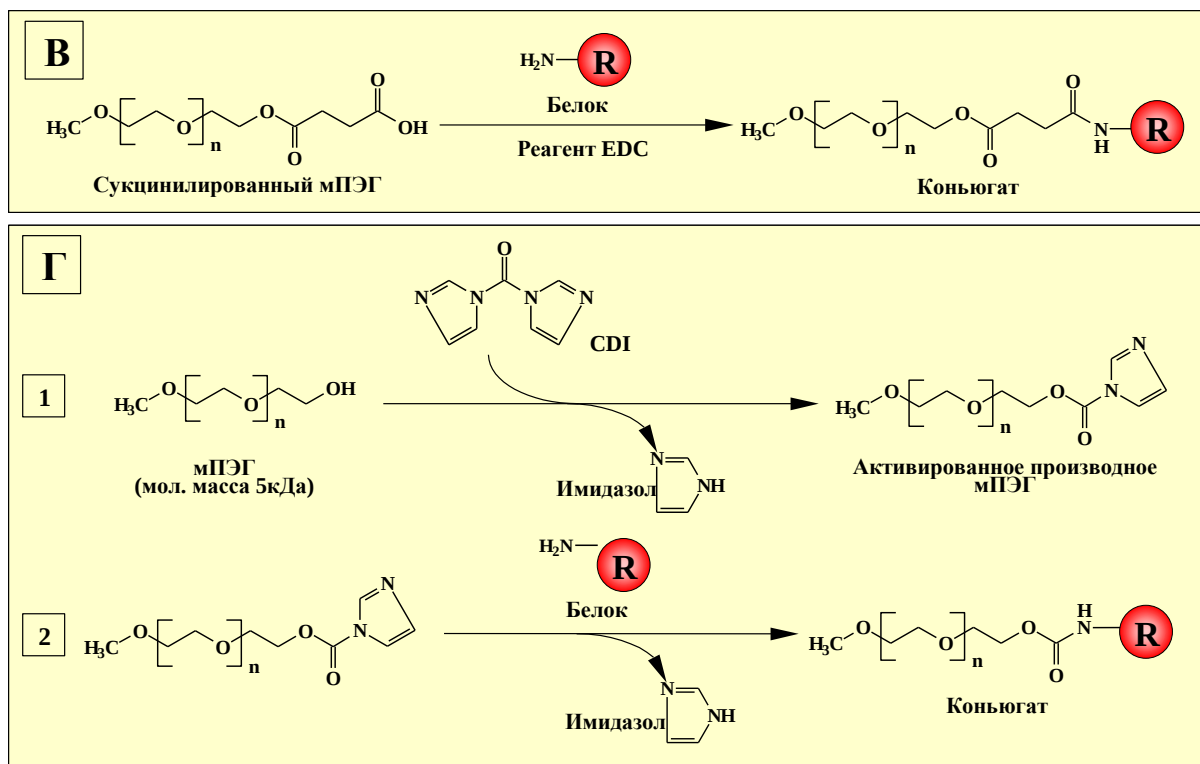


Рис. 82 (продолжение). В. Сукцинированный мПЭГ может быть также использован в карбодимидной реакции для модификации белков. **Г.** Реагент CDI (N,N'-карбонилимидазол) используют для активации гидроксильной группы мПЭГ. Далее активный интермедиат образует стабильный конъюгат с белком.

введении, оказалась крайне низкой (LD_{50} более 15 г/кг веса тела). Представленные и имеющиеся в литературе обширные данные подтверждают низкий уровень токсичности полиэтиленгликолей.

Поскольку полиэтиленгликоли рассматриваются как практически нетоксичные вещества (ежедневная доза потребления ПЭГ определена ВОЗ в 10 мг/кг массы тела), они широко применяются при производстве лекарств, в медицине, пищевой промышленности и косметологии. Жидкие ПЭГ (ПЭГ 200 и ПЭГ 400) используются как смешивающиеся с водой растворители содержимого мягких желатиновых капсул. Водные растворы ПЭГ часто используют в качестве суспендирующих агентов, а также регуляторов вязкости и консистенции различных фармакологических носителей лекарственных препаратов. ПЭГ совместно с другими эмульгаторами могут выступать в качестве стабилизаторов эмульсий. Полиэтиленгликоли ПЭГ 300 и ПЭГ 400 (30% растворы, об./об.) применяются в качестве носителей плохо растворимых терапевтических агентов. Такие препараты используют для парентерального применения. Также ПЭГ применяют для получения гранулированных форм лекарственных препаратов. В этом случае порошок, содержащий терапевтический агент и 10% (вес./вес.) ПЭГ 6000, нагревают до 70°C. При охлаждении образующейся пастообразной массы формируются гранулы (термопластическое гранулирование). Твердые ПЭГ применяют для покрытия таблеток тонкой оболочкой, а также в качестве гидрофильных

полировочных материалов. ПЭГ 400 применяется в качестве пластификатора при производстве таблеток. ПЭГ с мол. массами 200–40000 Да применяют в качестве связующих веществ при производстве таблеток, свечей и кремов. ПЭГ с мол. массами от 20 тыс. до 10 млн. применяют при инъекциях. Например, полиоксидин (раствор, содержащий ПЭГ 20000, NaCl и KCl) вводят внутривенно в качестве плазмозамещающего средства. Полиоксидин изотоничен и изоонкотичен плазме крови. Благодаря ПЭГ полиоксидин удерживает жидкость в сосудистом русле, и после его инфузионного введения возрастает объем циркулирующей крови и сердечный выброс. Кроме того, препарат уменьшает вязкость крови и оказывает дезагрегирующее действие на форменные элементы. ПЭГ также применяются в онкологии для стабилизации и пролонгирования действия противоопухолевых химиопрепаратов. ПЭГ с мол. массами 300–6000 Да индуцируют гибридизацию (слияние) клеток, поэтому применяются в качестве фьюзогена для получения гибридом при производстве моноклональных антител. Таким образом, благодаря низкой токсичности и уникальным физико-химическим свойствам полиэтиленгликоли находят широкое применение не только в фармацевтике, медицине, косметологии и пищевой промышленности, но и нанобиотехнологии.

Пэгилированные белки

Одним из важнейших направлений разработки препаратов на основе ПЭГ для медицинского применения является получение пэгилированных форм терапевтических белков [75]. В настоящее время получен и применяется в медицинской практике целый ряд пэгилированных белков: аденозиндезаминаза, аспарагиназа, альфа-интерферон-2b, гормон роста человека, интерлейкин-2, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор G-CSF и др. (табл. 7). Важным следствием пэгилирования белков является изменение их фармакокинетических и фармакодинамических свойств. В частности, пэгилирование белков приводит к увеличению времени их полужизни. Время полужизни (полувыведения, полуэлиминации, полусуществования) – это время, за которое концентрация введенного препарата в крови снижается на 50%, или время выведения 50% биодоступного количества препарата. Следует отметить, что термин «время полуэлиминации» является более емким, чем «время полувыведения», поскольку лекарственные препараты не только просто выводятся из организма, но и подвергаются биотрансформации. Время полужизни нативной аденозиндезаминазы (мол. масса от 35 кДа (низкомолекулярная форма) до 440 кДа (высокомолекулярная форма)) составляет 0,5 ч, а пэгилированного фермента в 56 раз больше (28 ч); нативной аспарагиназы (мол. масса 140–150 кДа) – 20 ч, а пэгилированного фермента – в 18 раз больше (360 ч); нативного альфа-интерферона-2b (мол. масса около 19 кДа) – 4 ч, а пэгилированного белка – в 10 раз больше (40 ч); нативного свободно выводящегося через почки (мол. масса негликозилированного белка около 15 кДа) интерлейкина-2 – 0,05 ч, а пэгилированного белка (ПЭГ 6000) – в 6 раз больше (0,3 ч) [361]. Поры, через которые в почках фильтруется плазма, имеют средний диаметр около 3 нм, поэтому все компоненты

плазмы с мол. массой до 5 кДа свободно проходят через мембрану; молекулы с мол. массой менее 60 кДа лишь частично проходят через поры; наконец, крупные молекулы с мол. массой свыше 65 кДа не попадают в первичную мочу и не выводятся из организма через почки. Таким образом, вводимые внутривенно низкомолекулярные белки и пептиды быстро выводятся из организма через почки и характеризуются непродолжительным временем полужизни. Время полужизни пэгилированного белка во многом определяется длиной цепи ПЭГ, используемого для модификации. Конъюгаты с более длинными цепями ПЭГ, как правило, характеризуются более продолжительным временем полужизни. Конъюгаты белков, модифицированные разветвленными цепями ПЭГ, также отличаются более продолжительным временем полужизни, поскольку они в меньшей степени подвержены биотрансформации [361].

В настоящее время на рынке представлены разнообразные препараты, основу которых составляют пэгилированные белки. Эти препараты применяются при лечении таких серьезных патологий, как острая лимфобластная лейкемия, миелоидная лейкемия, почечноклеточная карцинома, меланома, гепатиты В и С, СПИД, тяжелый комбинированный иммунодефицит, ревматоидный артрит и др. (табл. 7). В то же время к пэгилированным терапевтическим белкам поддерживается неослабевающий интерес научного сообщества, что является основой для разработки все новых и новых эффективных препаратов для лечения широкого спектра патологий.

Липидные системы и наночастицы

Помимо пэгилированных белков в настоящее время широко исследуются и уже применяются в медицинской практике наночастицы, основу структуры которых составляют липиды. Популярность липидных наночастиц связана с тем, что составляющие их липиды и фосфолипиды способны образовывать разнообразные структуры, обладающие низкой токсичностью, хорошей биосовместимостью и биodeградебельностью. Из липидных наноструктур, применяемых для транспортировки лекарственных препаратов, следует отметить твердые липидные частицы, дискосомы, липидные ленты, микротрубки, микропузырьки, кохлиты, кубосомы, различные виды липосом [262, 263] (рис. 83, табл. 8). Как и перечисленные выше липидные наноструктуры, жировые эмульсии и масляные суспензии, представляющие собой липидные системы, могут выступать в роли носителей различных фармацевтических препаратов.

Жировые микроэмульсии

Жировые микроэмульсии типа «масло в воде» используются для солюбилизации и транспорта жирорастворимых терапевтических агентов (табл. 8) [56, 57]. Также жировые эмульсии применяют для парентерального питания. По сравнению с липосомами частицы микроэмульсий имеют больший удельный гидрофобный объем и, соответственно, емкость для водонерастворимых неполярных веществ. Для получения микроэмульсий используют

воду, жидкие масла и поверхностно активные вещества (ПАВ). При интенсивном встряхивании или обработке ультразвуком смеси перечисленных компонентов получают микроэмульсии. В случае если в качестве непрерывной фазы выступает вода, образуются

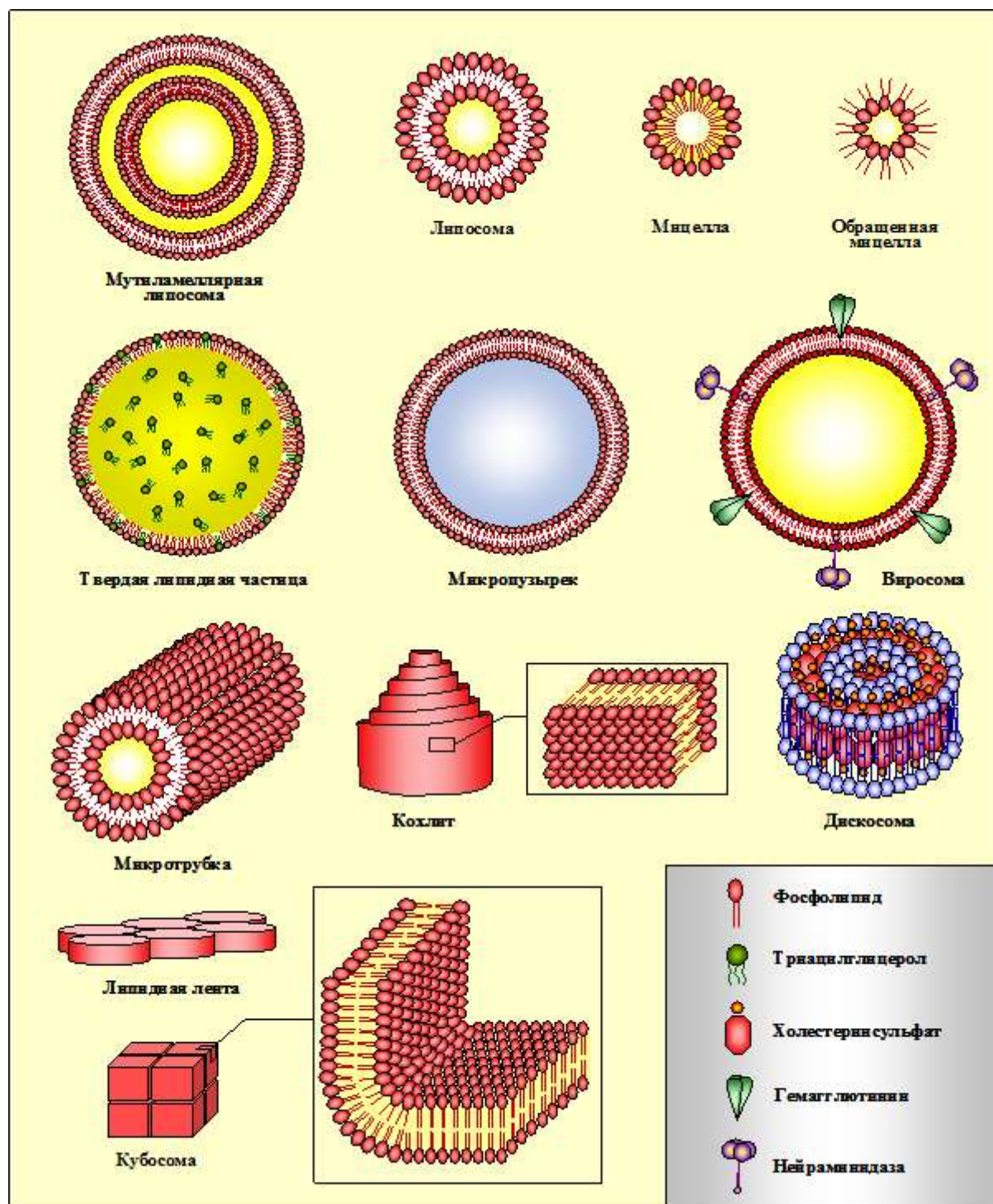


Рис. 83. Различные виды липидных наночастиц, используемых для транспорта терапевтических агентов.

липидные микроэмульсии типа «масло в воде», в которых частицы представляют собой липидные наноразмерные сферы, окруженные слоем ПАВ, например, фосфатидилхолина. Для изучения кинетики ферментативных реакций с жирорастворимыми субстратами применяют эмульсии типа «вода в масле». Например, для определения ферментативной

Таблица 8. Липидные транспортные наносистемы

Система	Активное вещество	Область применения	Статус	Ссылка
ДИСКОСОМЫ				
Дископодобные фосфолипидные структуры	Амфотерицин В	Микозы	Препарат Amphotec®	[78]
ФОСФОЛИПИДНЫЕ ЛЕНТЫ				
Лентоподобные фосфолипидные структуры	Амфотерицин В	Микозы	Препарат Abelcet®	[338]
КУБОСОМЫ				
Кубосомы на основе моноолеина	Индометацин	Противовоспалительное средство	Конструирование	[86]
КОХЛИТЫ				
Улиткоподобные и рулетоподобные структуры на основе фосфатидилсерина	Амфотерицин В	Микозы	Конструирование	[282]
СУСПЕНЗИИ И ЭМУЛЬСИИ				
Масляные суспензии	Соматотропин	Ветеринария	Препарат Posilac®	[124, 383]
Субмикронные липидные эмульсии	Лидокаин, тетракаин, дибукаин	Трансдермальная доставка	Конструирование	[144]
Жировые микроэмульсии	Кальцеин (белковый флуоресцентный маркер)	Диагностика	— // —	[57]
ТВЕРДЫЕ ЛИПИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ				
Немодифицированные	Инсулин Подофиллотоксин Тамоксифен	Диабет Рак — // —	Лабораторные испытания	[186] [392] [265]
Покрытые полиэтиленгликолем или хитозаном	Кальцитонин	Гиперкальциемия	— // —	[262]
Липидный кор из глицерил-капрата, покрытый бета-1,3-глюканом	Доксорубицин	Рак	— // —	[323]

активности липаз используют эмульсию водного раствора фермента в октане, стабилизированную синтетическими детергентами. Микроэмульсии используют также для изучения мембранного транспорта, разделения и концентрирования белков. Сложные эмульсии, представляющие собой капельки воды в масляных каплях, взвешенных в водном

Таблица 8 (продолжение). Липидные транспортные наносистемы

Система	Активное вещество	Область применения	Статус	Ссылка
СФЕРИЧЕСКИЕ И ЦИЛИНДРИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ				
Микротрубки	TGF- β , NGF, миоглобин, альбумин, тиреоглобулин, плазмидная ДНК	Пролонгированное высвобождение терапевтических агентов	Конструирование, лабораторные испытания	[207, 208]
Микропузырьки (микросферы, заполненные флуоресцирующим газом)	Антитела к ICAM-1	Диагностика раннего атеросклероза	— // —	[362]
Микросферы	Иммуноглобулины	В составе аэрозолей	— // —	[28]
Липосферы	Мелатонин	Фотозащитное средство	— // —	[346]
Микроцилиндры	Трансформирующий фактор роста β (TGF- β)	Заживление ран	— // —	[315]
МИЦЕЛЛЫ				
Фосфолипидные, стабилизированные ПЭГ	Камптотецин Паклитаксел	Рак	Лабораторные испытания	[161] [365]
Квантовые точки, покрытые монослоем фосфолипидов и стабилизированные ПЭГ	Квантовые точки	Визуализация опухолей	— // —	[238]
Фосфолипидные, стабилизированные ПЭГ, с иммобилизованными на поверхности антителами к антигенам поверхности опухолевых клеток	Доксорубин	Рак	— // —	[82]
Мицеллы, состоящие из смеси ПЭГ–фосфатидилэтаноламина и D- α -токоферил-ПЭГ-сукцината	Камптотецин	Рак	— // —	[216]
ВИРОСОМЫ				
Каркас из белка теплового шока (HSP) с иммобилизованным RGD-пептидом	Доксорубин	Меланома	Лабораторные испытания	[91]
Каркас из белка теплового шока (HSP) с иммобилизованными антителами к рецептору CD4	Доксорубин	Меланома	Лабораторные испытания	[91]
Вirus мозаики коровьего гороха (CPMV)	— // —	Рак	— // —	[196]

растворе, используют в качестве носителей, обеспечивающих пролонгированное высвобождение терапевтических агентов при внутривенных введениях. Уже получены подобные эмульсии, содержащие медленно высвобождающиеся в кровяном русле белки, такие как инсулин, гормон роста и др.

Масляные суспензии

Масляные суспензии представляют собой дисперсии белков в маслах, предназначенные для их пролонгированного высвобождения после внутривенной инъекции препарата. Для повышения вязкости масляных суспензий в них добавляют загустители (гелеобразующие агенты), подобные моностеарату алюминия. Загустители замедляют скорость высвобождения белка и снижают коэффициент его распределения между масляной фазой и тканью-мишенью, обеспечивая пролонгированность действия препаратов. На основе масляной суспензии разработан препарат Posilac®, содержащий соматотропин, суспендированный в кунжутном масле, содержащем моностеарат алюминия [37]. Также разработан препарат пролонгированного действия для парентерального применения, содержащий суспензию белкового фактора G-CSF, стимулирующего колонии гранулоцитов, в суспензионной среде масло/высокомолекулярный спирт [52] (табл. 8).

Твердые липидные наночастицы

Твердые липидные наночастицы представляют собой коллоидные частицы твердых липидов диаметром 50–1000 нм, способные транспортировать и высвобождать терапевтические агенты (рис. 83, табл. 8). Липидные наночастицы состоят из несущего терапевтический агент твердого липидного кора, покрытого фосфолипидным монослоем. Гидрофобные цепи фосфолипидов встроены в липидный кор, который содержит стабилизирующие систему эмульгаторы, такие как полисорбат-80 или лецитин. Гидрофобные белки (например, лизоцим) могут быть введены в состав наночастиц путем растворения в расплаве липидов кора при повышенных температурах. Липидные наночастицы получают с помощью методов гомогенизации при высоком давлении, микроэмульгирования, преципитации и др. В отличие от полимерных наночастиц, липидные наночастицы нетоксичны и биodeградебельны, они могут быть использованы для перорального, парентерального, пульмонарного или наружного применения [351]. Увеличения скорости высвобождения терапевтических агентов из липидных частиц можно добиться путем введения в их состав поверхностно активных веществ, активирующих эндогенные липазы.

Дискосомы

Дискосомы – липидные наночастицы дискообразной формы (рис. 84). Один из противогрибковых препаратов представляет собой липидные дискосомы, несущие антибиотик амфотерицин В (табл. 8). Дискосомы также применяют при исследовании белков с помощью ЯМР-спектроскопии благодаря тому, что в дисперсии под действием магнитного поля не только сами дискосомы ориентируются в пространстве специфическим образом, но также способствуют ориентации присутствующих в растворе белков.

Липидные ленты

Липидные ленты, или липидные листы, представляют собой наноструктуры, включающие фосфолипиды (димиристоилфосфатидилхолин и димиристоилфосфатидилглицерин) и антибиотик амфотерицин В (рис. 84, табл. 8). Антибиотик и фосфолипиды формируют специфические лентоподобные структуры толщиной $\sim 2,5$ нм и длиной ~ 250 нм, которые входят в состав противогрибкового лекарственного препарата Abelcet® [338].

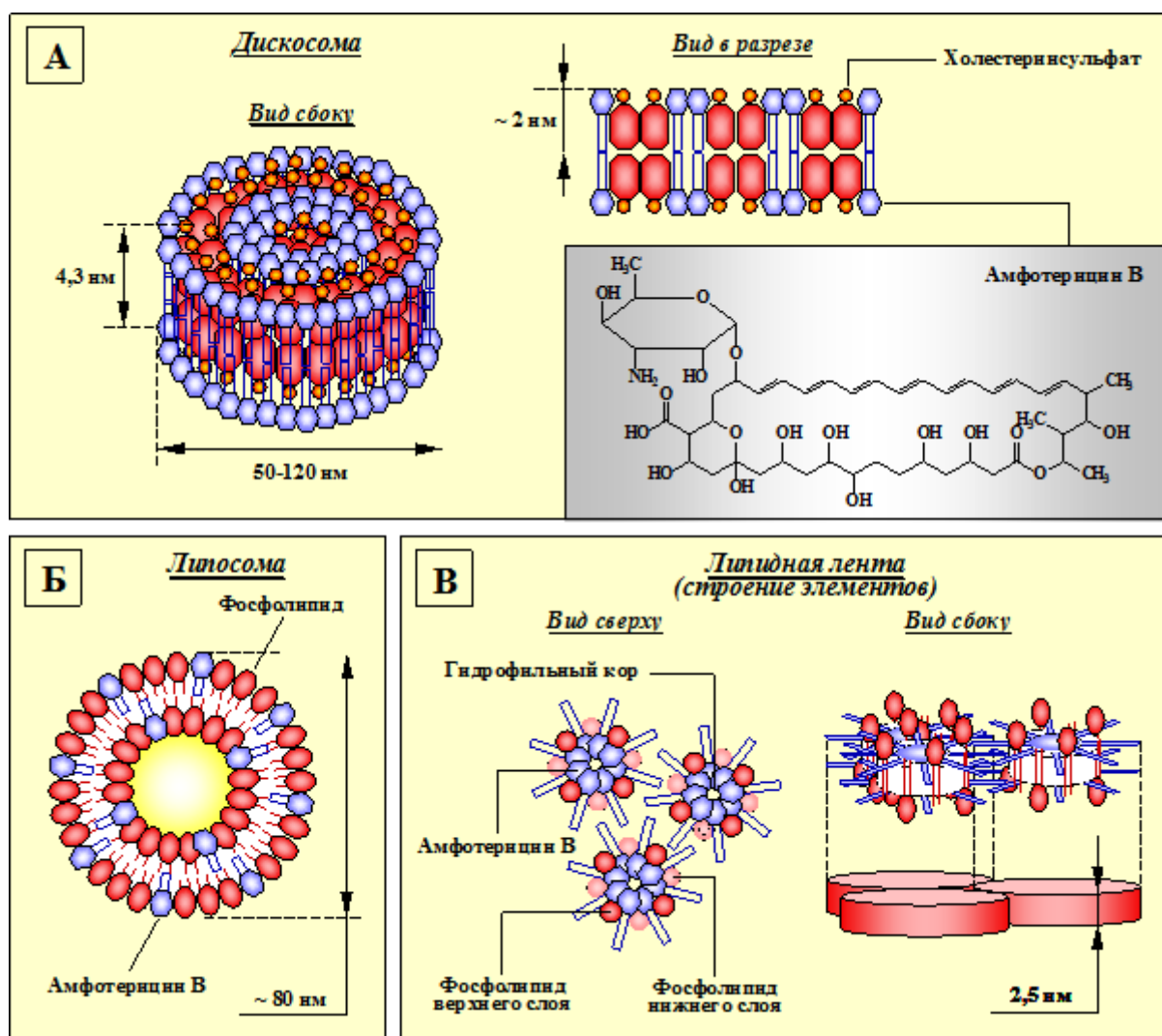


Рис. 84. Липидные наноструктуры, включающие противогрибковый антибиотик амфотерицин В. А. Дискосомы – дископодобные структуры, состоящие из холестеринсульфата и амфотерицина, – составляют основу препарата Amphotec® (Three Rivers Pharmaceuticals, США). Б. В основе препарата AmBisome® (NeXstar Pharmaceutical, Astellas Pharma, США) лежат бислойные липосомы, построенные из фосфолипидов и амфотерицина. В. Препарат Abelcet® (Enzon Pharmaceuticals, США) включает сложноорганизованные липидные ленты или листы, состоящие из фосфолипидов и амфотерицина.

Липидные микротрубки

Липидные микротрубки (рис. 83) образуются при охлаждении растворов таких поверхностно активных веществ, как, например, диацетиленовый фосфолипид 1,2-бис(трикоза-10,12-дииноил)-sn-глицеро-3-фосфохолин. Поверхностно активные вещества кристаллизуются в плотно упакованные бислои, которые спонтанно формируют цилиндрические структуры диаметром менее 1000 нм и длиной от 20 до 45 мкм [207, 208]. По строению микротрубки напоминают полые макароны, стенки которых образованы одним или более липидными бислоями. Микротрубки отличаются стабильностью в водных растворах, не вызывают воспалительных реакций и могут быть использованы для транспорта различных терапевтических агентов, белков, пептидов и олигонуклеотидов. В качестве терапевтических агентов в состав микротрубок могут быть включены факторы роста (TGF- β , NGF), миоглобин, плазмидная ДНК и др. (табл. 8). При внутривенном введении микротрубки служат не только средством защиты и транспорта терапевтических агентов, но и обеспечивают их пролонгированное действие. Очевидно, что липидные микротрубки являются перспективными носителями терапевтических агентов, однако необходимы дополнительные исследования для объективной оценки возможностей их применения в области медицины.

Липидные микропузырьки

Липидные микропузырьки представляют собой наполненные газом микросферы с фосфолипидной, белковой или полимерной оболочкой (рис. 83). Микропузырьки могут быть получены путем обработки ультразвуком растворов белков (альбумина) или некоторых полимеров [362]. Стабильные, способные циркулировать в кровяном русле липидные микропузырьки представляют собой заключенные в фосфолипидную оболочку газы. В состав таких пузырьков могут быть включены белки или другие биоактивные вещества, предназначенные для терапии тех или иных патологий. Благодаря низкой плотности и высокой эластичности липидные микропузырьки могут найти применение в качестве усилителей контрастности изображения при ультразвуковой диагностике. Весьма перспективным представляется также применение нагруженных противоопухолевым агентом и уязвимых к действию ультразвука микропузырьков для терапии злокачественных новообразований. После накопления таких пузырьков в зоне развития опухоли локальное ультразвуковое воздействие приведет к разрушению микропузырьков и высвобождению противоопухолевого агента.

Кохлиты

Кохлиты (от англ. cochlea – улитка) представляют собой цилиндрические наноструктуры, образуемые спирально закрученными фосфолипидными бислойнными лентами [387] (рис. 83, табл. 8). Описаны кохлиты, состоящие из несущего положительные

заряды фосфолипида фосфатидилхолина и ДНК, которые формируют своеобразные «рулеты» липидных бислоев с прокладкой из нуклеиновой кислоты [386]. Кохлиты также образуют отрицательно заряженные фосфолипиды, такие как фосфатидилсерин [282]. При добавлении к водной суспензии фосфатидилсерина катионов, например, Ca^{2+} , происходит их взаимодействие с отрицательно заряженными головками фосфолипидов. Это приводит к перестройке фосфолипидного бислоя, его сворачиванию и упаковке в твердые спиральные структуры типа кохлитов. Помимо ДНК, между образующими кохлиты спирально закрученными бислоями фосфолипида могут быть заключены гидрофильные терапевтические агенты, а внутри бислоя – гидрофобные. Лиофилизированные препараты кохлитов могут применяться как перорально, так и внутривенно (после ресуспендирования в физиологическом растворе или другом подходящем фармакологическом носителе).

Кубосомы

Кубосомы представляют собой наночастицы, составленные из смеси липидов, образующих кубоподобные структуры (рис. 85, табл. 8). Как и другие наночастицы, кубосомы можно использовать для транспорта лекарственных препаратов [86].

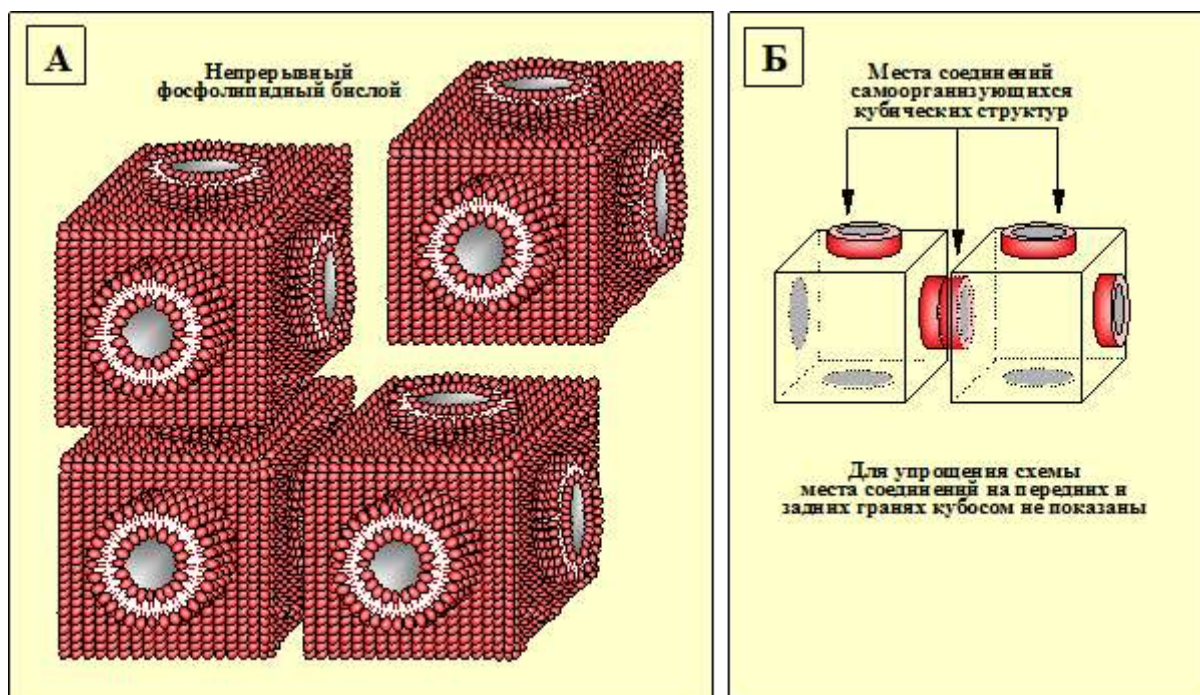


Рис. 85. Строение (А) и схема соединения (Б) элементов кубосом. Расстояние между единичными элементами кубосомы составляет около 20 нм; размер кубосомы 100-1000 нм.

Липосомы

Липосомы представляют собой заполненные водной средой замкнутые наносферы, оболочка которых состоит из фосфолипидов, организованных в виде двуслойной мембраны (рис. 83). Липосомы могут нести как гидрофильные биологически активные вещества,

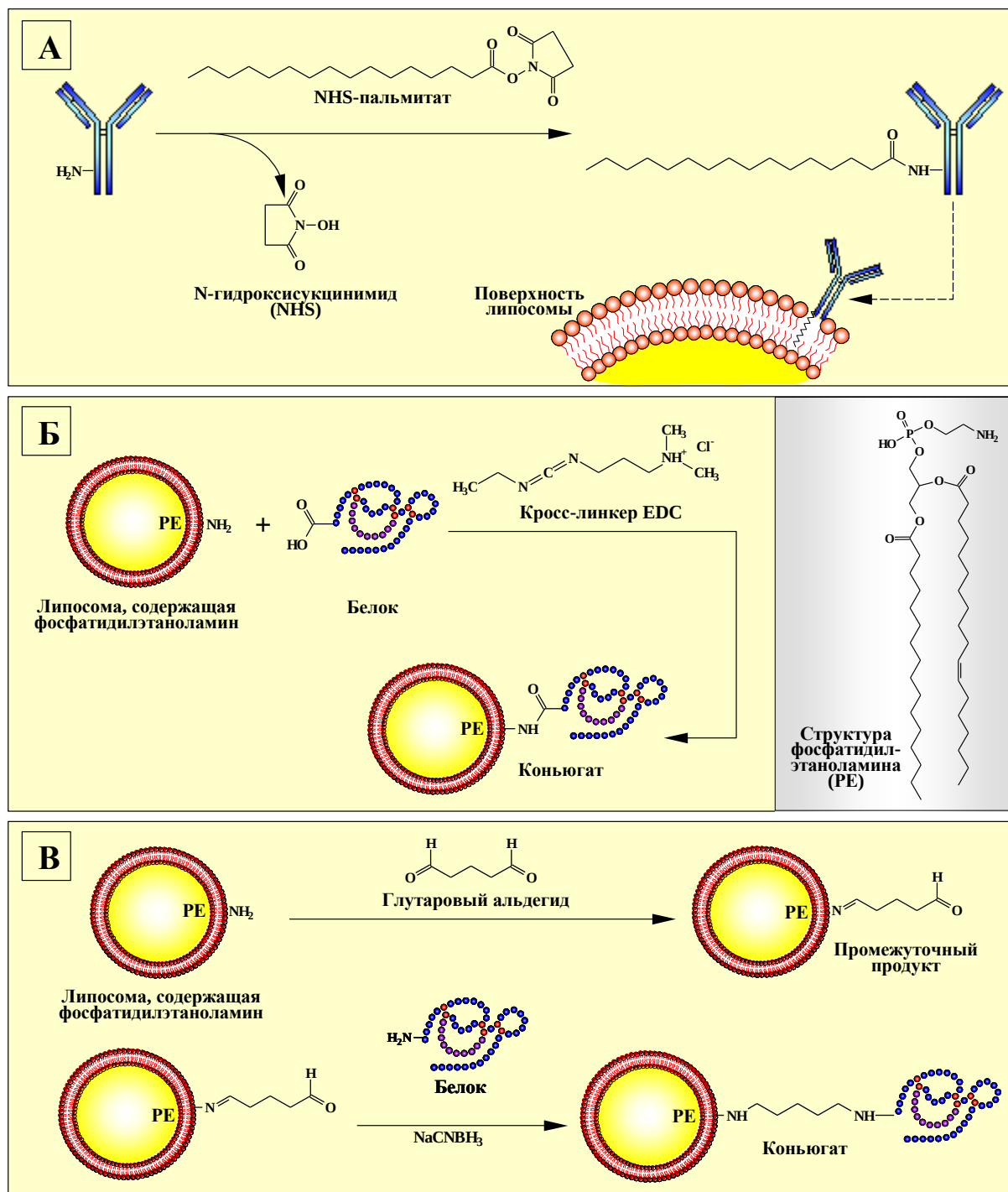


Рис. 86. Схемы реакций включения в состав липосом антител или иных векторных молекул с помощью N-гидроксисукцинимидного производного пальмитиновой кислоты (А) и кросс-линкеров карбодиимида EDC (Б) и глутарового альдегида (В). Модификацию поверхности липосом векторными белками или антителами проводят по аминогруппе входящего в состав фосфолипидного бислоя фосфатидилэтанолamina. При получении конъюгатов могут быть использованы как карбоксильные (Б), так и аминогруппы (В) белка.

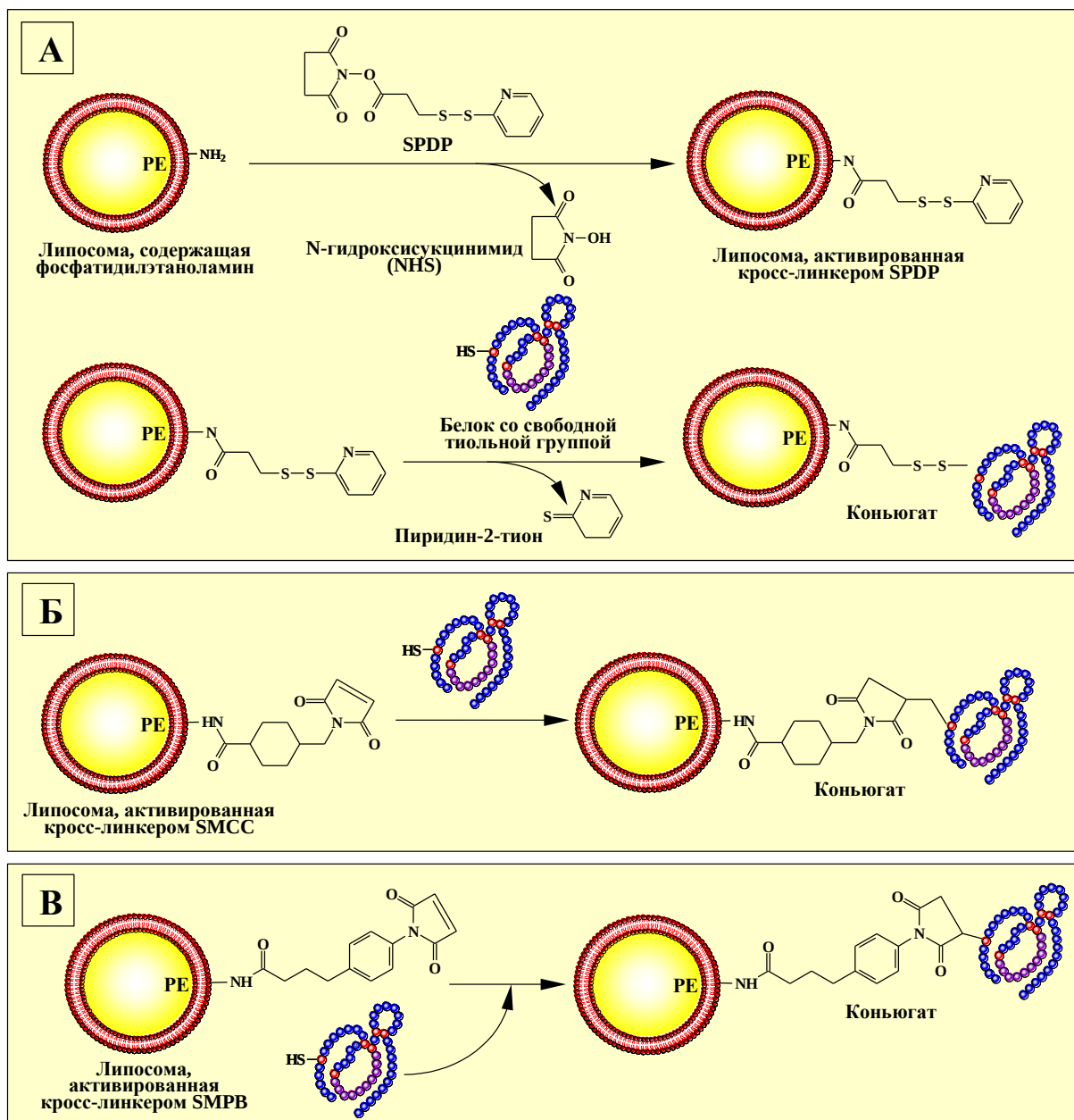


Рис. 87. Схемы реакций включения в состав липосом белков, антител или иных векторных молекул с помощью гетеробифункциональных кросс-линкеров SPDP (А), SMCC (Б) и SMPB (В). Модификацию липосом проводят по аминогруппе входящего в состав фосфолипидного бислоя фосфатидилэтаноламина (структура приведена на рис. 86).

локализованные в водной среде внутреннего кора, так и гидрофобные, «растворенные» в фосфолипидном бислое. Фосфолипиды являются амфифильными молекулами, способными к формированию сферических (липосомы, мультиламеллярные липосомы, мицеллы), цилиндрических, трубчатых, кубических и других наноразмерных структур. При построении таких структур соблюдается общий принцип – полярные головки фосфолипидов ориентируются в сторону водной фазы, а их неполярные углеводородные цепи формируют гидрофобное, изолированное от водного окружения ядро. Для доставки активных веществ

Таблица 9. Липосомные терапевтические препараты

Название	Активное вещество	Область применения	Статус	Ссылка
Daunoxome®	Даунорубицин	Саркома Капоши	Препарат	[247]
Myocet®	Доксорубицин	Рецидивирующий рак молочной железы, рак яичника, саркома Капоши	Препарат	[11]
Doxil®/Caelyx®	— // —	— // —	Препарат	[270]
Ambisome®	Амфотерицин В	Микозы	Препарат	[78]
OncoTCS®	Винкрестин	Рецидивирующая агрессивная неходжкинская лимфома	Препарат	[284]
VincaXome®	— // —	Острая лимфобластная лейкемия, меланома, неходжкинские лимфомы	Клинические испытания I-II фаза	[284]
Visudyn®	Вертепорфин	Дегенеративные повреждения сетчатки	Препарат	[230]
Invivac®	Поверхностный антиген вируса гриппа	Вирусные инфекции	Препарат	[67]
Липофлавон	Кверцетин	Острый инфаркт миокарда, стенокардия, ишемическая болезнь сердца, миокардиты, кардиодистрофии при химиотерапии рака молочной железы	Препарат	[175]
NX211	Лурботекан (полусинтетический аналог камптотецина)	Рак яичника	Клинические испытания I-II фаза	[104]
Липосомный аннамицин	Аннамицин (липофильный аналог доксорубицина)	Опухоли, резистентные к доксорубину	Клинические испытания I-II фаза	[25]
SPI-77	Цисплатин	Немелкоклеточный рак легкого, рак яичника, рак поджелудочной железы, злокачественные мезотелиомы	Клинические испытания II фаза	[368]
Atragen™	Транс-ретиноевая кислота	Рецидивирующая болезнь Ходжкина, метастазирующий рак почек	Клинические испытания II-III фаза	[234]
DepoCyte®	Цитозин арабинозид	Лимфоматозный и лейкемический менингит	Клинические испытания II фаза	[170]
Липосил®	Силимарин	Болезни печени Карциномы молочной железы и простаты, легочная карцинома, фибросаркома	Препарат Доклинические испытания	[399]
Липосомные ангиостатин, эндостатин	Ангиостатин Эндостатин	Меланома — // —	Лабораторные испытания	[400]
Интерферон-2α (мультивезикулярные липосомы)	Интерферон-2α	Вирусные инфекции	Конструирование	[256]

конструируют различные виды липосом, например, pH- и термочувствительные, «нацеленные», «стерически стабилизированные» и др. [336]. pH-чувствительные липосомы

характеризуются высоким или, наоборот, низким значением pH внутренней среды, в которой вещество несет заряд и пребывает в прочно связанном с фосфолипидами состоянии. При попадании, например, в кислую среду, характерную для опухолевой ткани, происходит естественная нейтрализация pH внутренней среды липосомы, в результате которой активное вещество теряет заряд, что позволяет ему свободно проходить через мембрану липосомной частицы и проникать в опухолевые клетки. Для доставки терапевтических агентов в клетки макрофагов используют обычные фосфолипидные липосомы, которые быстро поглощаются клетками ретикуло-эндотелиальной системы. Такие липосомы перевариваются в фагосомах макрофагов, а действующее вещество высвобождается и проявляет терапевтический эффект. Липосомы могут также нести иммобилизованные на поверхности специфические лиганды и антитела, которые способны «узнавать» определенные рецепторы или антигены, присутствующие на поверхности клеток-мишеней («нацеленные» липосомы) [336] (рис. 86, 87).

В настоящее время на фармацевтическом рынке присутствует несколько противоопухолевых препаратов, основу которых составляют липосомы с включенными в их состав доксорубицином, даунорубицином, анрамицином, третиноином (транс-форма ретиноевой кислоты), винкристином и др. (табл. 9). По сравнению со свободными противоопухолевыми препаратами их липосомные формы менее токсичны и обладают более пролонгированным и эффективным действием. Несмотря на эти преимущества, липосомы довольно быстро захватываются и инактивируются макрофагической (ретикулоэндотелиальной) системой организма. Причиной этого служит опсонизация липосом в плазме крови. Белки опсоны являются компонентами системы комплемента, и после их включения в состав липосом последние быстро распознаются и поглощаются макрофагами. Для выведения липосом из сферы действия макрофагической системы, увеличения времени их циркуляции в кровяном русле и повышения эффективности действия производят модификацию их поверхности полиэтиленгликолем – синтетическим полимером с гибкой гидрофильной цепью. Для модификации липосом обычно используют фосфолипиды, ковалентно связанные с полиэтиленгликолем (рис. 88). Модифицированные ПЭГ липосомы называют «пэгилированными» или «стерически стабилизированными». Обладающие высокой гидрофильностью, гибкостью и подвижностью цепи ПЭГ препятствуют взаимодействию белков с поверхностью липосом, в результате чего они становятся как бы «невидимыми» и недостижимыми для макрофагов. Такие липосомы также называют «стелс-липосомами», или «липосомами-невидимками» (от англ. слова *stealth*, обозначающего невидимый для радиолокационных систем самолет). Обычные липосомы пребывают в кровотоке недолго – от нескольких минут до нескольких часов, что резко снижает их терапевтическую эффективность. Стерически стабилизированные липосомы могут пребывать в кровотоке более двух суток и отличаются высокой эффективностью терапевтического действия [103]. В настоящее время исследуются различные препараты, полученные на основе стерически стабилизированных липосом, а противоопухолевый препарат Doxil®, представляющий собой наполненные доксорубицином стерически стабилизированные

липосомы, состоящие из фосфатидилхолина и холестерина, широко применяется в клинической практике для лечения рака печени, простаты, молочной железы, а также саркомы Капоши (табл. 9).

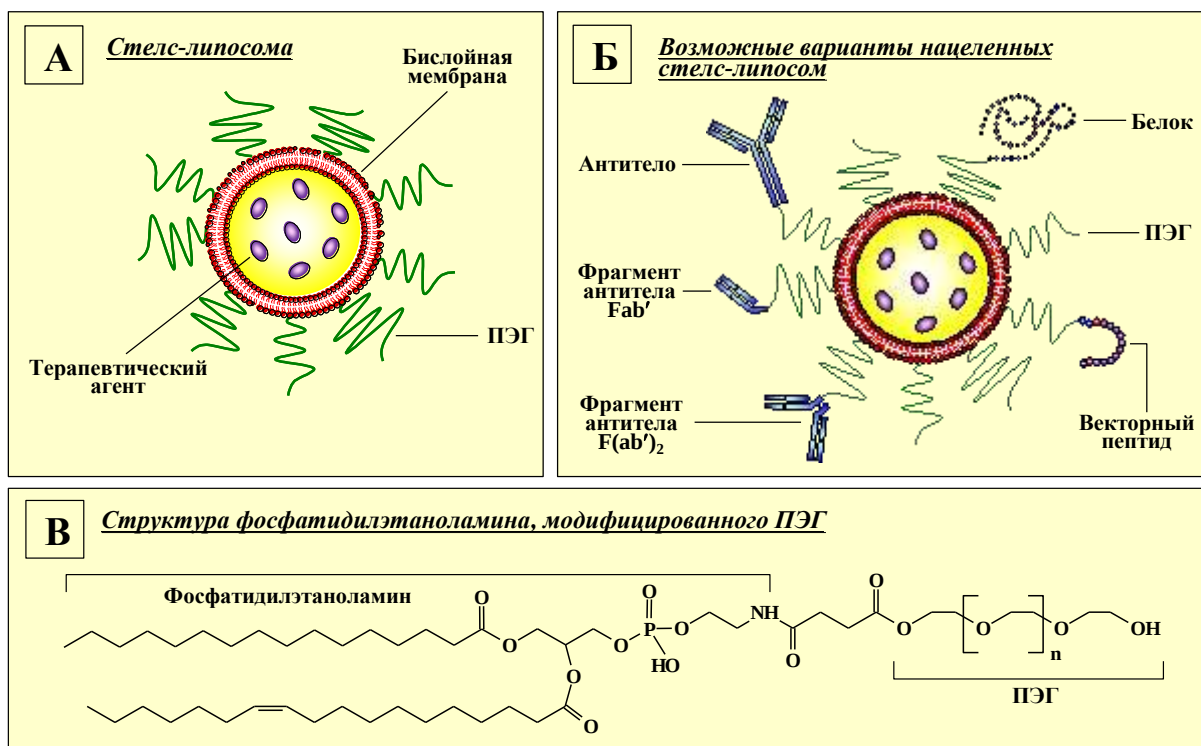


Рис. 88. Стерически стабилизированные липосомы и структура входящего в их состав модифицированного фосфатидилэтаноламина. **А.** Стерически стабилизированные липосомы, или «стелс-липосомы» (от англ. слова «stealth», которое можно перевести как «невидимка»), не распознаются ретикуло-эндотелиальной системой. Стерически стабилизированные липосомы получают путем включения в их состав модифицированного полиэтиленгликолем (ПЭГ) фосфатидилэтаноламина. Такие липосомы также называют «пэгиллированными». **Б.** Стерически стабилизированные «нацеленные» липосомы используются для направленной доставки терапевтических агентов к клеткам-мишеням. В качестве векторных компонентов таких липосом, распознающих клетки-мишени, могут выступать различные белки, антитела и их пептидные фрагменты. **В.** Структура модифицированного полиэтиленгликолем фосфатидилэтаноламина.

В некоторых случаях при использовании липосомных препаратов требуется не избегать действия макрофагической системы, а, напротив, поражать макрофаги. Известно, что макрофаги являются специализированными клетками, защищающими организм от патогенных микроорганизмов. Однако некоторые микроорганизмы выработали действенные средства защиты от поглощения и деструкции макрофагами. Для облигатных клеточных паразитов, например, различных видов *Leishmania*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Lysteria monocytogenes* и др., цитоплазма и лизосомы макрофагов являются средой

обитания. В этих случаях применение обычных непэгилированных липосом, несущих антибиотики, является эффективным средством борьбы с паразитарными инфекциями. Например, липосомный препарат Ambisome®, доставляющий антибиотик амфотерицин В в инфицированные клетки (макрофаги активно поглощают липосомные частицы), успешно применяется в клинической практике для лечения как системных грибковых заболеваний, так и лейшманиоза (табл. 9).

Мицеллы

Мицеллы представляют собой самоорганизующиеся замкнутые монослойные сферические фосфолипидные наноструктуры [336]. Различные поверхностно активные вещества также могут образовывать мицеллы. Гидрофильные головки фосфолипидов составляют обращенную к водной среде поверхность мицеллы, а ацильные «хвосты» – гидрофобный кор (рис. 83). Как и липосомы, мицеллы успешно применяются в качестве носителей гидрофобных терапевтических агентов (табл. 8). В качестве носителей терапевтических агентов могут быть также использованы обращенные мицеллы, представляющие собой агрегаты фосфолипидов или других ПАВ, образующиеся в неполярных растворителях. Неполарные ацильные «хвосты» фосфолипидов расположены на поверхности мицеллы и контактируют с неполярным растворителем, а полярные фосфолипидные головки – внутри мицеллы (рис. 83).

Виросомы

Вирусоподобные наночастицы, или виросомы, представляют собой небольшие сферические частицы размером 100–200 нм, окруженные замкнутой двуслойной фосфолипидной мембраной, в которую могут быть включены гликопротеины и белки, способствующие слиянию мембраны виросомы и клетки-мишени. Для улучшения слияния мембран чаще всего используют белки вируса гриппа – гемагглютинин и нейраминидазу. Для реализации биомедицинских и нанотехнологических задач в качестве оболочки виросомы помимо фосфолипидов используют лишенные генетического материала капсиды вирусов (мозаичного вируса коровьего гороха, парвовируса собак, бактериофагов и др.). С помощью химических или генно-инженерных методов к поверхности капсида могут присоединяться векторные молекулы (антитела и лиганды рецепторов, трансферрин, фолиевая кислота и др.), антигены, терапевтические агенты и т.д. Интересно, что капсид парвовируса собак обладает достаточно высоким сродством к гиперэкспрессируемому опухолевыми клетками рецептору трансферрина. Поэтому виросомы, полученные на основе парвовирусов и нагруженные противоопухолевыми препаратами, могут применяться для терапии злокачественных новообразований. Уже получены и активно исследуются противоопухолевые препараты на основе виросом, каркасы которых построены из белка теплового шока или оболочки вируса мозаики. Такие виросомы нагружают противоопухолевым антрациклиновым антибиотиком доксорубицином. Виросомы могут

также служить основой для создания различных вакцин. Для этого могут использоваться как капсиды вирусов, так и виросомы, получаемые путем самосборки из смеси фосфолипидов и вирусных антигенов нейраминидазы и гемагглютинаина (рис. 83). Антигены могут адсорбироваться на поверхности, а также встраиваться в мембрану или располагаться внутри виросом. В организме, подобно вирусной частице, виросома поглощается антигенпрезентирующей клеткой (например, макрофагом), после чего фрагмент антигена презентруется на поверхности этой клетки в составе главного комплекса гистосовместимости типа II (ГКГС II) и узнается Т-хелперными клетками. После связывания с комплексом [фрагмент антигена–ГКГС II] Т-хелперные клетки активируются и начинают активно делиться, создавая целый клон клеток, способных распознавать данный антиген. После этого клетки клона Т-хелперов узнают В-клетки, презентующие тот же фрагмент вирусного антигена в составе ГКГС II, связываются с В-клетками и вызывают их селективное клонирование. Продуцируемый Т-хелперными клетками интерлейкин стимулирует созревание и превращение В-клеток в плазматические клетки, активно синтезирующие и секретирующие в кровь антитела против вирусного антигена. Таким образом, с помощью виросом осуществляется активация иммунного ответа против вирусной инфекции. Теперь при попадании в кровь вируса он будет быстро обезврежен с помощью антител и других средств иммунологической защиты организма. В настоящее время уже применяются виросомные вакцины против гриппа, гепатита В и папилломы. Также получены вирусоподобные частицы, включающие белки вируса Эбола – гликопротеин GP и белок матрикса VP40. Такие частицы могут с успехом применяться для стимуляции гуморального и клеточного иммунитета. Помимо создания эффективных вакцин, виросомы могут также найти применение в области генной терапии в качестве средства доставки в клетки-мишени генетического материала. При этом по эффективности трансфекции генов виросомные системы оказываются сравнимыми с вирусными векторами.

В связи со все возрастающими потребностями молекулярной медицины в биосовместимых эффективных системах транспорта лекарственных препаратов в последние годы осуществляется активная разработка технологий получения наноразмерных транспортных систем, основой которых служат различные виды липидов. Увеличивающееся число рекомбинантных терапевтических белков также требует разработки систем, обеспечивающих их биологическую стабильность и эффективную доставку к тканям-мишеням. Липидные системы транспорта отличаются высокой стабильностью, биосовместимостью и биodeградебельностью. Эти системы, как правило, обладают достаточно высокой емкостью для терапевтических препаратов, обеспечивают их стабильность в кровяном русле и пролонгированность действия. Кроме того, производство липидных систем транспорта не требует крупных финансовых затрат. В связи с этим уже в ближайшее время следует ожидать новых оригинальных разработок в области создания липидных транспортных систем, а также увеличения числа полученных на их основе лекарственных препаратов.

Полимерные наночастицы

Полимерные нанокапсулы и наносферы

Нанокапсулы представляют собой полые, ограниченные замкнутой полимерной оболочкой наноразмерные (обычно 100–500 нм) сферы, которые могут содержать внутри водную или масляную фазу (рис. 89). По сути, липосомы также можно отнести к нанокапсулам. Полимерные (например, полицианоакрилатные) нанокапсулы применяются в качестве носителей терапевтических агентов. На поверхности таких нанокапсул могут быть иммобилизованы антитела или другие векторные молекулы, способные распознавать определенные клетки-мишени. Особенно широко нанокапсулы применяются в косметике для доставки и пролонгированного высвобождения заключенных в них биологически активных веществ и витаминов к подкожным слоям [151]. В настоящее время компания «L’Oreal» (Франция) производит крем от морщин, в составе которого присутствуют нанокапсулы размером 200 нм, включающие витамин А [309, 310].

В отличие от нанокапсул, полимерные наносферы представляют собой сплошные, по глубине пористые шары, способные транспортировать терапевтические агенты (рис. 89). Для получения полимерных наносфер применяют как синтетические полимеры, например, поли(алкилцианоакрилаты) или сополимеры молочной и гликолевой кислоты, так и природные, например, коллаген, крахмал, хитозан и другие. В отличие от многих других синтетических полимеров, поли(алкилцианоакрилаты) пригодны для введения в организм и при небольших размерах частиц (менее 25 кДа) могут выводиться из него через почки. Преимуществом сополимеров молочной и гликолевой кислоты является биodeградебельность, и на основе этих полимеров уже получены противоопухолевые препараты (табл. 10).

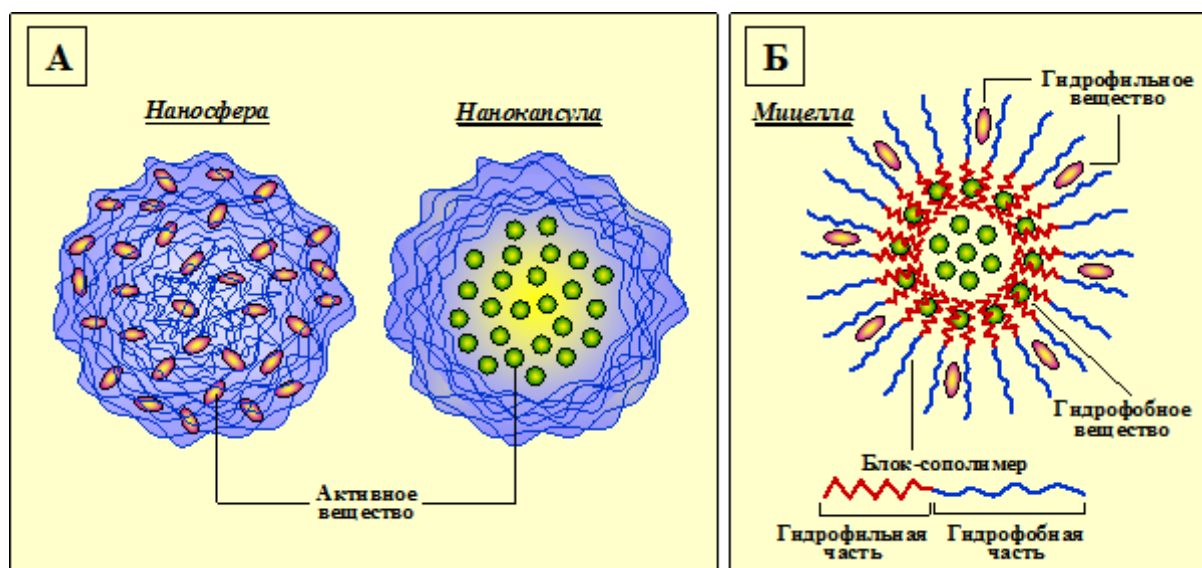


Рис. 89. Полимерные наночастицы, предназначенные для транспорта терапевтических агентов. А. Полимерная пористая наносфера и нанокапсула с полимерной оболочкой. Б. Полимерная мицелла.

Таблица 10. Полимерные транспортные наносистемы

Название	Полимер	Активное вещество	Область применения	Статус	Ссылка
НАНОЧАСТИЦЫ					
Vivitrol®	Сополимер молочной и гликолевой кислоты (PLGA)	Налтрексон	Алкогольная и наркотическая зависимость	Препарат (2006)	[304]
PLGA-Taxol	— // —	Паклитаксел (таксол)	Глиобластома, плоскоклеточный рак гортани	Доклинические испытания	[218, 379]
Nano-D-AMB	— // —. Покрытие – димеркаптоэтантарная кислота (DMSA)	Амфотерицин В	Микозы	Доклинические испытания	[5]
CCGN-Insulin	Полиметилметакрилат. Покрытие – карбоксилированный хитозан	Инсулин	Диабет	Доклинические испытания	[60]
ADM-PBCA-NP	Полибутилцианоакрилат	Доксорубин	Рак	Доклинические испытания	[303]
DATS-PBCA-NP	— // —	Диаллилтрисульфид	Гепатоклеточная карцинома	Доклинические испытания	[389]
PBCA-NGF	Полибутилцианоакрилат. Покрытие – полисорбат-80	Фактор роста нервов (NGF)	Болезнь Паркинсона	Доклинические испытания	[173]
Endorem®, Sinerem®, Feridex®	Декстран	Оксид железа	Магнитная резонансная томография	Препарат (2006)	[41, 330]
ПОЛИМЕРНЫЕ МИЦЕЛЛЫ					
Genexol-PM (PEG-PLA-Taxol)	Полиэтиленгликоль–поли-L-лактид	Паклитаксел (таксол)	Рак легкого, яичника, молочной и поджелудочной железы	Клинические испытания	[156]
PEG-PAA-DOX (NK911)	Полиэтиленгликоль–поли-L-аспартат	Доксорубин	Рак	Клинические испытания	[219]
PEG-pluronic-DOX	Полиэтиленгликоль–плюроник	Доксорубин	Рак	Доклинические испытания	[13]
ПВП-ангиостат ПВП-эндостат ПВП-силибин	Поли-N-винилпирролидон	Ангиостатин, эндостатин, силибинин	Рак	Доклинические испытания	[406]
ДЕНДРИМЕРЫ					
Gadomer®	Тримезоил-бензентрикарбонильный кор и 2 поколения лизина	Гадолиний (III) (24 атома в комплексах с DOTA)	Магнитная резонансная томография	Клинические испытания	[51]
PAMAM-MTX	Полиамидоамин	Метотрексат	Эпителиальный рак	Доклинические испытания	[160]
PAMAM-platinate	Полиамидоамин	Платина	Рак	Доклинические испытания	[195]

Полимерные мицеллы

Полимерные мицеллы формируются в воде из амфифильных, состоящих из разных полимерных молекул блок-сополимеров (например, полиэтиленоксид (ПЭО)–полипропиленоксид (ППО), диолеилфосфатидилэтаноламин–полиэтиленгликоль и др.), которые организуются в наноразмерные структуры, имеющие гидрофобный кор и гидрофильную оболочку (рис. 89). Полимерные мицеллы формируются благодаря наличию в составе сополимера гидрофильных и гидрофобных блоков. Например, в блок-сополимере ПЭО–ППО полиэтиленоксид обладает высокой полярностью и гидрофильностью, тогда как полипропиленоксид отличается гидрофобностью. Гидрофобный кор полимерных мицелл может служить резервуаром для гидрофобных терапевтических агентов, а гидрофильная оболочка – для гидрофильных. Терапевтические агенты могут вводиться в состав полимерных мицелл либо путем физического инкапсулирования, либо химического присоединения. Гидрофильная оболочка (например, полиэтиленоксидная) препятствует опсонизации и последующему поглощению мицелл макрофагами. Благодаря этому свойству мицеллы, как и пэгилированные липосомы, отличаются длительным временем циркуляции в кровотоке и высокой эффективностью терапевтического действия. В настоящее время широко исследуются возможности применения полимерных мицелл различного состава для транспортировки терапевтических агентов (табл. 10). Особенно многообещающие перспективы сулит применение блок-сополимеров ПЭО–ППО, называемых плюрониками. На их основе получены препараты, представляющие собой мицеллы, «нагруженные» доксорубицином, амфотерицином В, диоксином, индометацином и галоперидолом. Как и в случае липосом, избирательность действия подобных препаратов может быть значительно увеличена путем присоединения к полимерным мицеллам векторных молекул, узнающих специфические рецепторы на поверхности клеток-мишеней.

Дендримеры

Дендримеры представляют собой синтетические полимерные макромолекулы, состоящие из мономерных звеньев, выходящих из центрального кора и формирующих разветвленную сеть (рис. 90). Ветвление в дендримерах носит регулярный характер. По строению дендримеры (от греч. dendron – дерево) напоминают кораллы или деревья. Благодаря небольшим размерам (нанометровый диапазон), стабильности в водных растворах, биосовместимости, возможности химических модификаций поверхности, мультивалентности и относительно высокой емкости для терапевтических агентов дендримеры могут найти широкое применение в медицине в качестве носителей лекарственных препаратов.

Дендримеры обычно получают методами контролируемого ступенчатого синтеза. Впервые контролируемый синтез полиаминоамидного дендримера был осуществлен в 80-х годах прошлого века. Схематическое изображение синтеза дендримера приведено на рис. 90 В. Для формирования кора дендримера использовали аммиак, количественно

метилакрилатом→очистка→реакция с диамином→очистка и т.д.) был получен дендример с мол. массой около $5 \cdot 10^5$.

Поверхность дендримера может быть модифицирована векторными молекулами, антигенами и терапевтическими агентами. Недавно был получен конъюгат полиамидного дендримера с противоопухолевым химиопрепаратом метотрексатом (табл. 10). Присутствие на поверхности большинства дендримеров аминогрупп создает условия для комплексообразования с нуклеиновыми кислотами, и таким образом дендримеры могут доставлять в клетку терапевтически активные антисмысловые нуклеиновые последовательности, гены и нуклеотиды. Поскольку дендримеры являются перспективными транспортными наночастицами, ведется интенсивный поиск путей их практического применения в области нанотехнологии и медицины.

Неорганические наночастицы

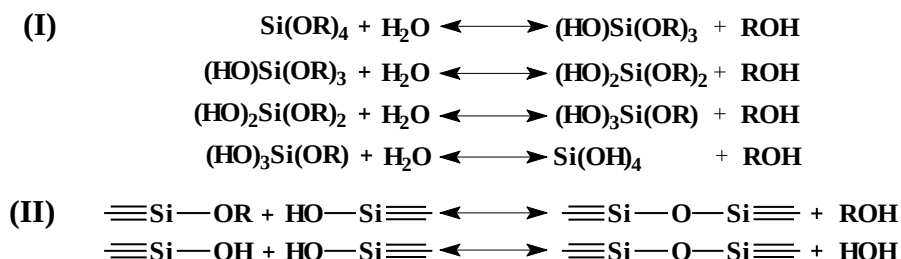
Неорганические наночастицы представляют собой наноструктуры, полученные на основе металлов и различных неорганических соединений. Свойства таких наночастиц значительно отличаются от свойств крупных блоков исходного вещества и составляющих эти блоки атомов. Эти отличия касаются химических, электронных, механических, фотофизических, оптических и других свойств наночастиц и во многом определяются их чрезвычайно высокой удельной поверхностью, или отношением площади поверхности к объему.

Наноразмерные объекты часто проявляют уникальные свойства, которыми не отличаются макрообъекты того же состава. Так, температура плавления мелкокристаллического золота с уменьшением размера частиц до 1–5 нм снижается на несколько сотен градусов, и твердые частицы золота могут плавиться прямо при комнатной температуре. При уменьшении размеров частиц алюминий становится горючим и самовозгорается, медь из непрозрачного вещества превращается в прозрачное, неактивные химически инертные в нормальных условиях металлы (золото, платина) приобретают каталитические свойства, а изолятор кремний становится хорошим проводником. Для получения неорганических наночастиц используют самые разнообразные материалы: металлы (палладий Pd, платину Pt, золото Au, серебро Ag, медь Cu, кадмий Cd, цинк Zn и др.), оксиды металлов (ZnO, NiO, Fe₃O₄, TiO₂, Al₂O₃ и др.), диоксид кремния SiO₂, карбонаты (CaCO₃, MgCO₃), карбиды (VC, TiC), нитриды (AlN, TiN), силикаты (соли кремниевых кислот H₂SiO₃, H₄SiO₄ и др.), фосфаты (Ca₃(PO₄)₂, Ca(H₂PO₄)₂, CaHPO₄), фториды (CaF₂, EuF₃, YF₃).

Керамические наночастицы

В настоящее время для получения наночастиц размером 50–100 нм и наноматериалов широко применяют керамику и металлокерамику. Керамические наночастицы получают

спеканием глин (глина – порода, состоящая из одного или нескольких минералов группы алюмосиликатов; значительную часть глин составляют Al_2O_3 и SiO_2) или мелкодисперсных порошков неорганических веществ. Многие виды наночастиц представляют собой композиты или композиционные материалы, состоящие из двух и более фаз с четкой межфазной границей. Для получения таких композитов алкоколяты кремния, алюминия, бора или титана подвергают гидролизу (I) с последующей реакцией поликонденсации гидроксидов (II):



В ходе поликонденсации гидроксидов образуется неорганическая керамика трехмерной сетчатой структуры. Для получения композитов в приведенные выше реакционные схемы включают готовые полимеры или активные олигомеры органических соединений (полиамид, полиимид, полистирол, полиметилметакрилат и др.). Посредством манипуляций составом компонентов и условиями реакции получают нанокompозиты разнообразной надмолекулярной структуры. На основе керамики и полимеров также получают слоистые нанокompозиты. Для этого применяют слоистые неорганические структуры (монтмориллонит, вермикулит), входящие в состав природной глины [151, 201, 367, 384].

Монтмориллонит представляет собой глинистый минерал, относящийся к слоистым силикатам: $(\text{Ca}, \text{Na} \dots) (\text{Mg}, \text{Al}, \text{Fe})_2 [(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}] (\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Монтмориллонит состоит из трехслойных пакетов (рис. 91А). В каждом пакете слой алюмогидроксильных октаэдров покрыт с двух сторон слоями кремнекислородных тетраэдров, обращенных вершинами друг к другу. При смачивании водой в межпакетное пространство легко проникают ионы и молекулы воды, вызывая сильное набухание минерала. Это связано с большим межпакетным расстоянием и слабостью связи между пакетами. Монтмориллонит отличается огромной удельной поверхностью (до $800 \text{ м}^2/\text{г}$) и значительной емкостью катионного обмена.

Вермикулит – слоистый минерал, получаемый при гидротермической обработке природной руды следующего состава: $(\text{Mg}^{2+}, \text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+})_3 [(\text{Si}, \text{Al})_4\text{O}_{10}] (\text{OH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Подобно монтмориллониту, вермикулит состоит из трехслойных пакетов. В каждом пакете слой, состоящий из октаэдров, с двух сторон покрыт слоями, образованными тетраэдрами. Вермикулит также обладает высокой емкостью катионного обмена.

Для получения нанокompозита межпакетные слои наночастицы монтмориллонита или вермикулита толщиной 1–2 нм насыщают посредством реакции ионного обмена мономером с активной концевой группой (бутадиеном, капролактамом, эпоксидной смолой и др.) и затем проводят реакцию полимеризации (рис. 91 Б). В результате получают наночастицы

слоистой структуры, включающие керамику и полимер и отличающиеся механической прочностью и термической устойчивостью. Потенциал практического применения керамических наночастиц активно изучается.

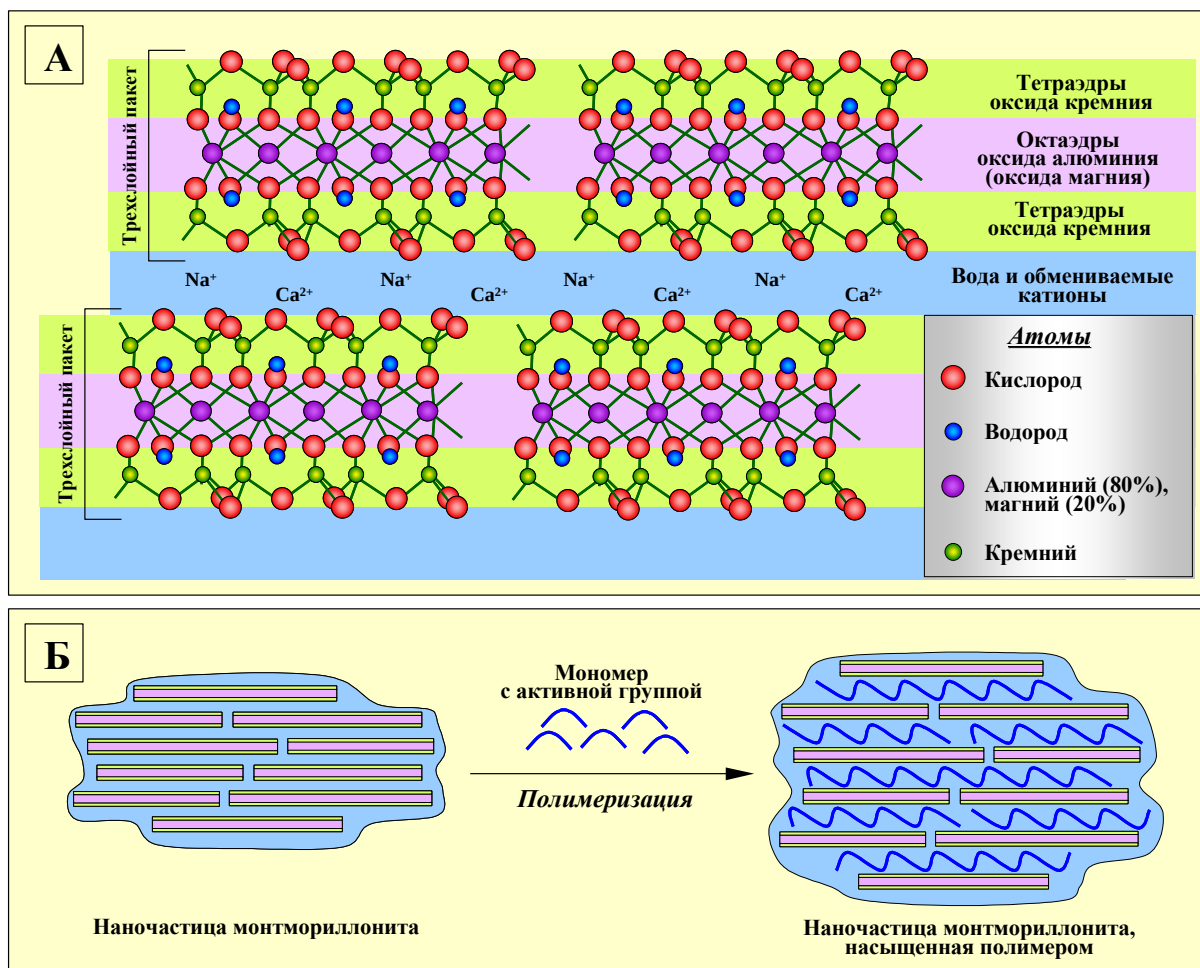


Рис. 91. Структура монтмориллонита и получаемых на его основе нанокомпозитов.
А. Монтмориллонит состоит из расположенных слоями трехслойных пакетов. В каждом пакете слой алюмогидроксильных октаэдров покрыт с двух сторон слоями кремнекислородных тетраэдров, обращенных вершинами друг к другу. При смачивании водой в межпакетное пространство легко проникают ионы и молекулы воды, вызывая сильное набухание минерала.
Б. Для получения нанокомпозитов межпакетные слои наночастиц монтмориллонита толщиной 1-2 нм в ходе реакции ионного обмена насыщают мономером с активной концевой группой (бутадиеном, капролактамом, эпоксидной смолой и др.) и затем проводят реакцию полимеризации. В результате получают наночастицы слоистой структуры размером 100 нм с высоким содержанием керамики, отличающиеся механической прочностью и термической устойчивостью.

Металлические наночастицы

Как и в случае нанокерамики, в настоящее время активно разрабатываются стратегии практического применения металлических наночастиц, которые получают путем испарения,

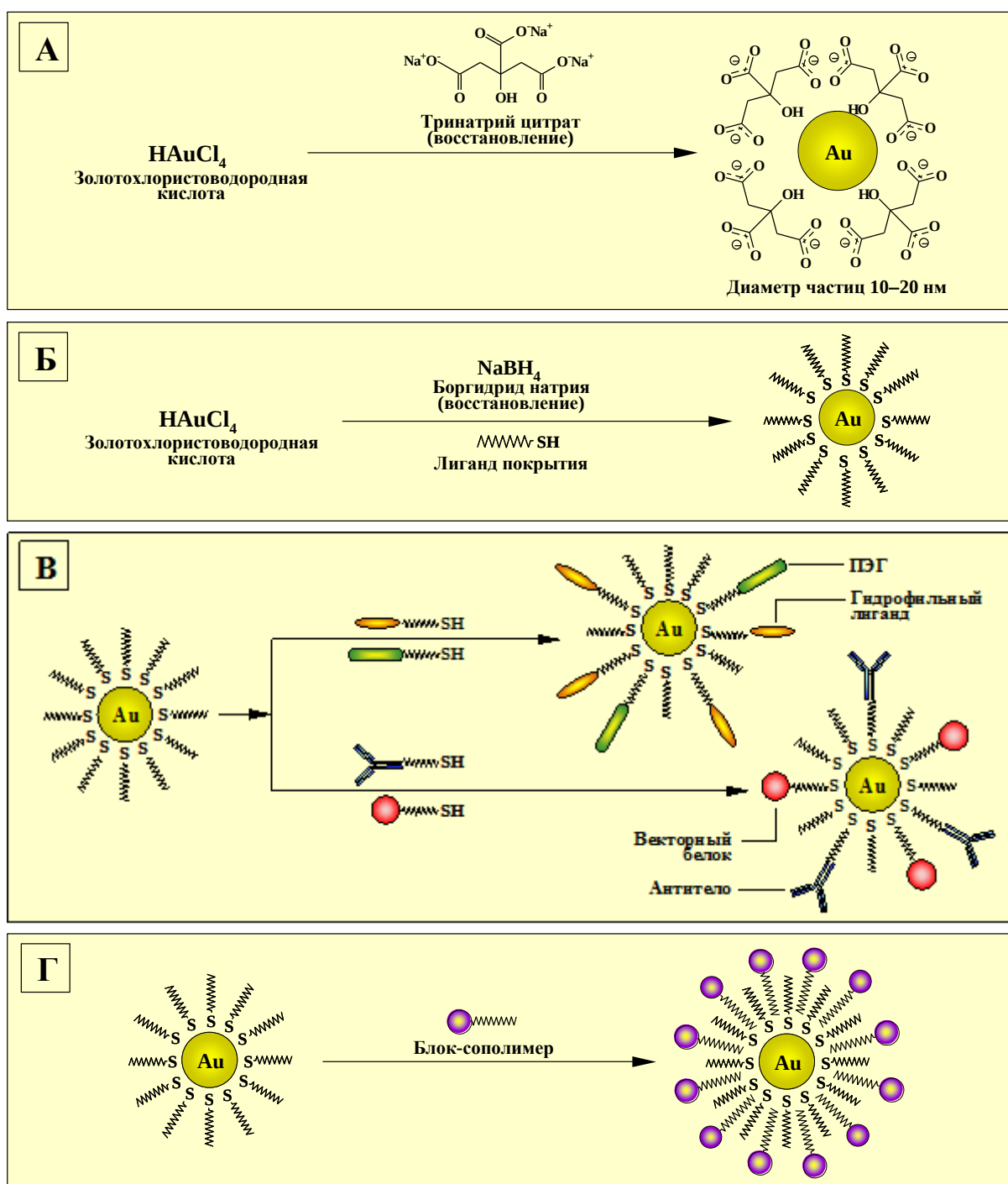


Рис. 92. Получение коллоидных суспензий золота и модификация золотых наночастиц. А, Б. Коллоидная суспензия золотых наночастиц может быть получена путем восстановления золота из золотохлористоводородной кислоты HAuCl_4 в присутствии тринатрий цитрата или боргидрида натрия и лиганда покрытия. В. Для увеличения гидрофильности и времени циркуляции в крови в состав наночастиц золота вводят полиэтиленгликоль (ПЭГ). В состав наночастиц золота могут быть также введены антитела или векторные белки, осуществляющие распознавание рецепторов, локализованных на поверхности клеток-мишеней. Г. Путем самосборки гидрофобные наночастицы золота могут быть введены в состав поверхностно-активных мицелл.

распыления или восстановления солей металлов [304]. Коллоидная суспензия, содержащая сферические частицы золота размером 10–20 нм, была получена еще в 1951 г. Дж. Туркевичем, который восстанавливал золотохлористоводородную кислоту HAuCl_4 солями лимонной кислоты (рис. 92 А). В дальнейшем металлические наночастицы получали более универсальным методом восстановления солей металлов в присутствии лигандов покрытия (рис. 92 Б). С помощью подобных методов восстановления могут быть получены наночастицы Ag, Cu, Pt, Pd.

В наши дни наиболее широкое применение в области нанобиотехнологии и медицины находят золотые наночастицы, обладающие низкой токсичностью для организма человека [17]. Для увеличения растворимости коллоидных частиц золота и модификации их поверхности используют процесс обмена местами (рис. 92 В). Модификацию поверхности гидрофобных наночастиц можно также производить путем их инкапсуляции в мицеллы (рис. 92 Г). С помощью модификаций поверхности металлических наночастиц можно не только вводить в их состав антитела, векторные белки и олигонуклеотиды, но и цепи полиэтиленгликоля, препятствующие поглощению наночастиц макрофагами [158]. Металлические наночастицы с модифицированной полиэтиленгликолем и антителами поверхностью могут быть использованы для подавления опухолевого роста путем блокирования рецепторов факторов роста, представленных на поверхности опухолевых клеток и эндотелиоцитов опухолевых кровеносных сосудов. Также путем связывания со специфическими участками ДНК с помощью металлических наночастиц может осуществляться регуляция транскрипции генов [50]. Следует ожидать, что металлические наночастицы в ближайшей перспективе найдут широкое применение в различных системах биомедицинской диагностики, а также в качестве наноразмерных транспортных систем, осуществляющих доставку лекарственных препаратов, антисмысловых нуклеотидных последовательностей и белков в клетки-мишени.

Нанокристаллы

Несмотря на высокий терапевтический потенциал, многие биологически активные вещества отличаются низкой растворимостью и, соответственно, низкой биодоступностью. Для повышения биодоступности разрабатываются технологии получения таких веществ в форме активных нанокристаллов с размерами 100–500 нм (табл. 11). В отличие от обычных порошков лекарственных субстанций, применение нанокристаллических суспензий приводит к резкому увеличению биодоступности и эффективности действия терапевтических агентов. Обычно нанокристаллы получают путем размельчения или гипербарической гомогенизации исходного крупнокристаллического вещества [143]. Преимуществом терапевтически активных нанокристаллов является отсутствие в их составе посторонних веществ. Терапевтические препараты на основе нанокристаллов могут применяться как перорально в виде таблеток, так и внутривенно в виде наносуспензий.

Для стабилизации и улучшения аппликационных свойств нанокристаллических

терапевтических препаратов применяют модификацию их поверхности ПАВ. В клинической практике при трансплантации органов применяют иммуносупрессивный нанокристаллический препарат Rapamune® [146]. Действующим веществом препарата является антибиотик рапамицин, продуцируемый микроорганизмами *Streptomyces hygroscopicus*. Антибиотик путем блокирования опосредованной ионами Ca^{2+} каскадной передачи регуляторных сигналов снижает активность Т- и В-лимфоцитов и подавляет отторжение аллогенного трансплантата.

Таблица 11. Нанокристаллы в медицине

Название	Активное вещество	Область применения	Статус	Ссылка
Rapamune®	Рапамицин	Иммуносупрессант при трансплантации	Препарат (2000)	[146]
Emend®	Апрепитант	Противорвотное средство	Препарат (2001)	[61]
Tricor®, Triglide®	Фенофибрат	Гиперхолестеринемия	Препарат	[347]
Megace ES®	Мегестрол	Анорексия, рак, СПИД	Препарат	[382]
Semapimod®	Гуанилгидразон	Ингибитор фактора некроза опухоли TNF- α	Клинические испытания II фаза	[312]
Paxceed®	Паклитаксел (таксол)	Противовоспалительное	Клинические испытания III фаза	[143]
Theralux®	Тиметакцин	Рак	Клинические испытания II фаза	[143]
Nucryst®	Серебро	Антибактериальное	Клинические испытания II фаза	[143]

Квантовые точки

Квантовые точки представляют собой сферические наночастицы, состоящие из неорганических полупроводниковых материалов, таких как кремний (Si), селенид кадмия (CdSe), фосфид индия (InP) и др. (рис. 93). Квантовые точки обладают полупроводниковыми свойствами и отличаются малыми размерами, например, получаемые из смешанного полупроводника CdSe квантовые точки содержат всего около 50 000 атомов, а их размер составляет от 1 до 5 нм. В некоторых отношениях квантовая точка ведет себя как отдельный атом и, подобно настоящему атому, содержит электрон (один или несколько), который имеет ряд стационарных уровней энергии с характерным расстоянием между этими уровнями. Электрон способен занять любой энергетический уровень квантовой точки, но не может располагаться между уровнями. После перехода электрона на более высокий энергетический уровень на месте его пребывания, то есть пустом низкоэнергетическом уровне, образуется так называемая «дырка» (положительно заряженный ион), с которой электрон связан посредством зарядных взаимодействий. Возвращение с более высокого энергетического уровня на прежний низкоэнергетический сопровождается излучением кванта света (фотона) и уменьшением энергии электрона. При облучении квантовой точки светом электрон

поглощает квант света и переходит на более высокий энергетический уровень (возбужденное состояние квантовой точки), после чего возвращается на низкоэнергетический уровень. Переход электрона на низкоэнергетический уровень сопровождается флуоресцентным свечением. Термином «флуоресценция» обозначают свечение под действием света видимого и УФ-диапазона. Флуоресценция представляет собой кратковременную ($t \sim 10^{-8} - 10^{-9}$ с) люминесценцию (люминесценция – более широкое понятие, обозначающее свечение вещества, происходящее после поглощения им энергии). Важно отметить, что часть энергии электрона при испускании и поглощении света расходуется на увеличение колебаний структуры и превращается в тепло. Спектр люминесценции всегда сдвинут относительно спектра поглощения в сторону длинных волн, поскольку часть поглощенной энергии расходуется на тепловое движение атомов и молекул. Поскольку разрешенные энергетические уровни в атоме, молекуле или квантовой точке стабильны, независимо от способа возбуждения и длины волны возбуждающего света спектр люминесценции при данной температуре остается неизменным. Благодаря способности к флуоресценции квантовые точки используют в качестве флуоресцентных меток. Важнейшим и уникальным свойством квантовых точек является испускание света строго определенной длины волны. Квантовая точка определенного размера излучает очень чистый свет, поскольку длина его волны располагается в узкой области спектра.

В отличие от атомов, частотами переходов электрона в квантовых точках можно управлять путем изменения размера наночастиц. Это означает, что идентичные по составу, но разные по размеру квантовые точки после облучения УФ-светом будут светиться

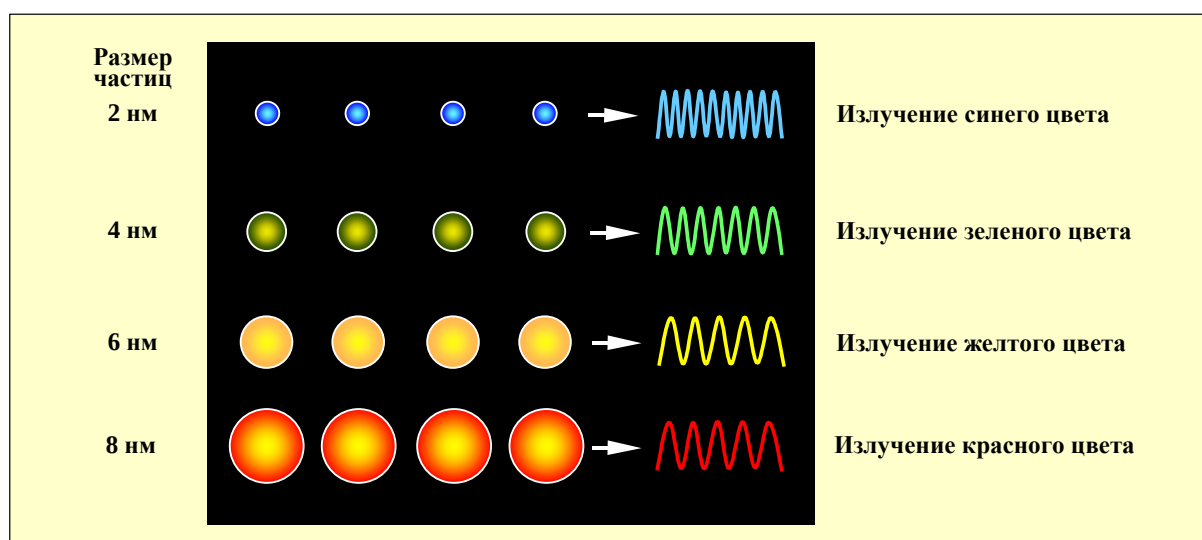


Рис. 93. Схематическое изображение квантовых точек. Квантовые точки представляют собой сферические наночастицы, обладающие полупроводниковыми свойствами. Квантовые точки, полученные из смешанного полупроводника (CdSe), могут включать более 50000 атомов. Идентичные по составу, но различные по размеру квантовые точки после облучения светом одной длины волны светятся разными цветами. Таким образом, путем изменения размера частиц можно регулировать длину волны испускаемого ими света. В области биомедицинских технологий квантовые точки применяются в качестве флуоресцентных меток.

разными цветами (рис. 93). С помощью квантовых точек можно проводить диагностику, в том числе и раннюю, онкологических заболеваний [204, 334]). Для этого на поверхности квантовых точек можно иммобилизовать антитела или векторные молекулы, узнающие специфические опухолевые антигены или рецепторы (рис. 94, табл. 12). Поскольку часто опухоли имеют густую и разветвленную кровеносную сеть, отличающуюся высокой

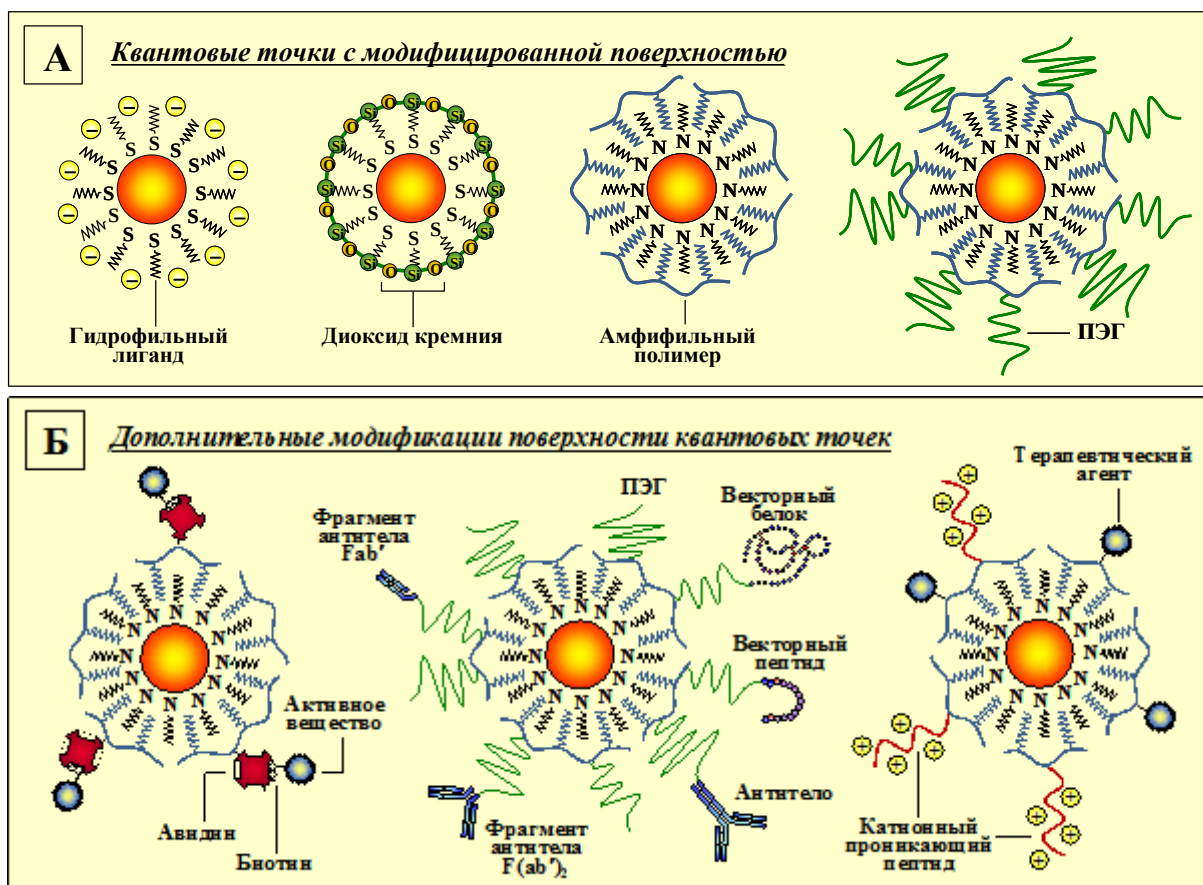


Рис. 94. Различные виды модификаций поверхности квантовых точек. А. Поскольку квантовые точки обладают низкой гидрофильностью и проявляют токсичность для организма, осуществляют покрытие их поверхности гидрофильными тиолами (например, меркаптоуксусной, меркаптоянтарной кислотой, цистеином) или аминокислотными лигандами. Квантовые точки, покрытые оболочкой из диоксида кремния, могут быть легко модифицированы органическими функциональными группами с помощью приемов химии силианов. Квантовые точки, инкапсулированные в амфифильные полимеры, образуют высокостабильные мицеллоподобные структуры. Для увеличения времени циркуляции в кровотоке поверхность квантовых точек модифицируют полиэтиленгликолем (ПЭГ). Б. К модифицированным гидрофильным квантовым точкам могут быть дополнительно ковалентно или нековалентно (например, через комплекс авидин-биотин) присоединены различные биологически активные молекулы – векторные белки, пептиды, антитела, терапевтические агенты. Квантовые точки, конъюгированные с катионными проникающими пептидами (англ. «cell penetrating peptide»), такими как катионный пептидный фрагмент TAT (от англ. trans-activator of transcription) белка капсида вируса иммунодефицита или пептид VP22 из вируса простого герпеса, могут эффективно связываться с поверхностью клеток и проникать в них в результате эндоцитоза.

Таблица 12. Применение квантовых точек (КТ) в биомедицинской диагностике

Область применения	Белки-мишени	Тип квантовых точек	Объект исследования	Ссылка
Исследование уровня экспрессии и распределения А-антигенов в эритроцитах	А-антигены эритроцитов	Поверхность КТ модифицирована глутаровым альдегидом, к которому ковалентно присоединены моноклональные антитела к А-антигенам	Эритроциты	[68]
Детектирование апоптоза клеток	Фосфатидилсерин поверхности клеточных мембран	Поверхность КТ модифицирована стрептавидином, к которому присоединен биотинилированный аннексин А-5	Все клетки	[182]
Определение резистентного фенотипа клеток	P-гликопротеин (P170) – мембранный транспортный белок	КТ, инкапсулированные в микросферы из карбоксилированного полистиренового латекса, модифицированного поливалентными антителами к P170	Карцинома молочной железы линии MCF-7	[321]
Контроль терапии гипOLIпидеми-ческими препаратами	Пероксисомный мембранный белок PMP70	Поверхность КТ модифицирована стрептавидином, к которому присоединены биотинилированные антитела к PMP70	Гепатоциты	[55]
Диагностика рака	Рецептор эпидермального фактора роста HER2	Поверхность КТ модифицирована стрептавидином, к которому присоединены биотинилированные антитела к рецептору HER2	Раковые клетки (биоптаты)	[45]
Определение локализации опухоли in vivo	Фолатные рецепторы опухолевых клеток	КТ, включенные в фосфолипидные липосомы, покрытые ПЭГ и модифицированные фолатом	Карцинома головы и шеи линии KB, мышечная лимфома линии J6456	[293]
Диагностика диабетической ретинопатии	Молекулы клеточной адгезии (PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1)	КТ, покрытые ПЭГ с присоединенными Fc-фрагментами моноклональных антител к PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1	Проллиферирующие эндотелиальные клетки ретинальных сосудов	[139]
Определение локализации опухоли in vivo	Интегрины	КТ, несущие на поверхности RGD (Арг–Гли–Асп)-пептиды	Васкуляризированные опухоли	[35]
Быстрое определение вида бактериального заражения	Поверхностные антигены Escherichia coli, Salmonella typhimurium	Поверхность КТ модифицирована стрептавидином, к которому присоединены биотинилированные антитела к антигенам бактерий	Организм человека	[381]
Ранняя диагностика рака, определение локализации опухоли	Рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР)	КТ, несущие на поверхности эпидермальный фактор роста (ЭФР)	РЭФР-положительные опухоли	[73]

проницаемостью, квантовые точки, не содержащие векторных молекул, могут также применяться для диагностики онкологических заболеваний. В экспериментах на лабораторных животных с привитыми злокачественными опухолями было продемонстрировано, что при введении в кровь квантовые точки быстро накапливаются в опухолевой ткани и опухоль может быть обнаружена визуально при просвечивании мощным источником света (например, ртутной лампой) [16]. Такой способ визуализации применим к опухолям, локализованным близко к поверхности кожи. Если будут созданы квантовые

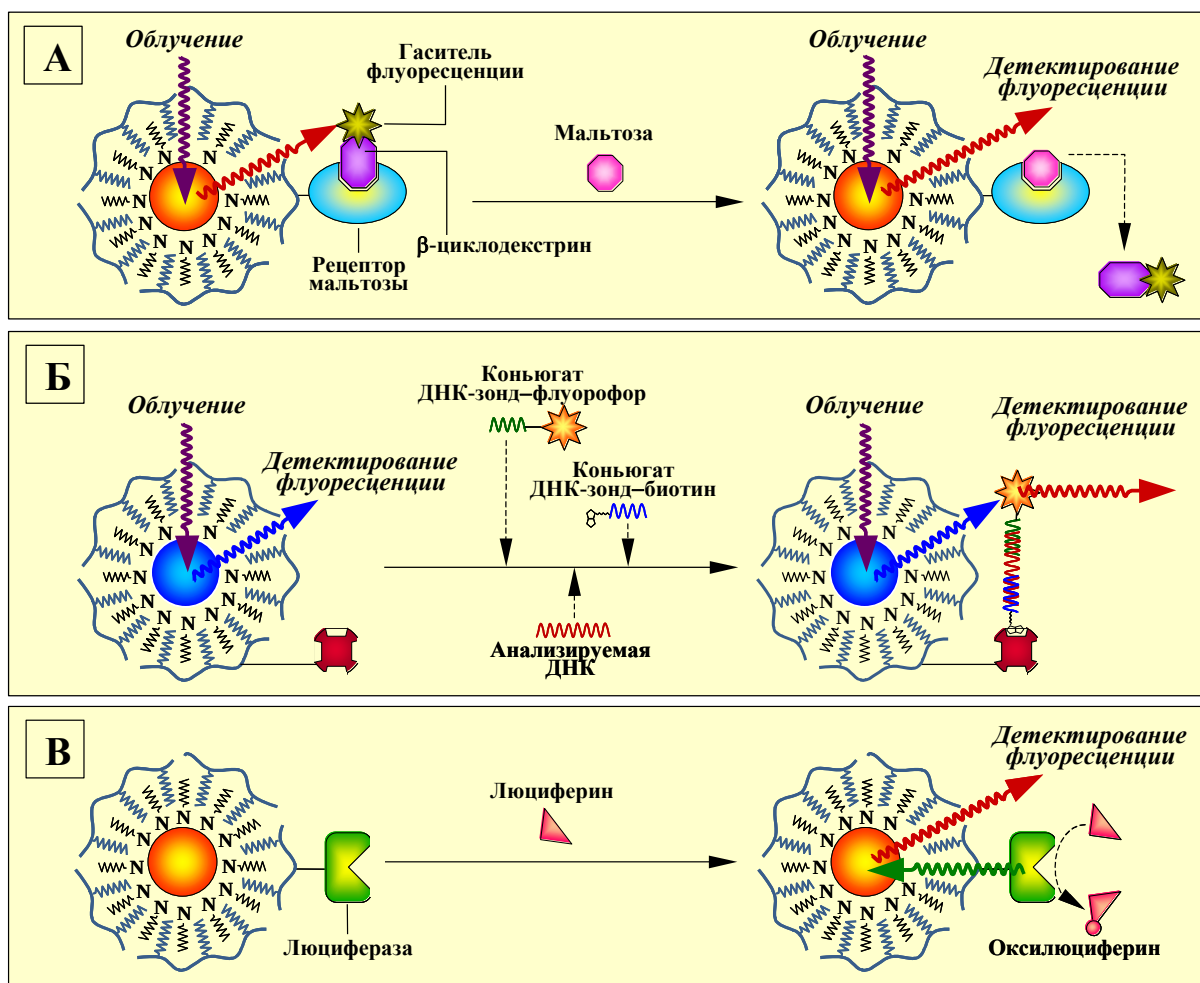


Рис. 95. Использование квантовых точек в качестве биосенсоров. А. Для количественного определения мальтозы поверхность квантовых точек модифицируют мальтозосвязывающим белком (рецептором мальтозы) из *E. coli*. Первоначально в среду добавляют конъюгат β -циклодекстрина с гасителем флуоресценции, который связывается с рецептором мальтозы. При облучении системы ответная флуоресценция квантовых точек не детектируется. Мальтоза, добавленная в среду, вытесняет и замещает конъюгат в связывающем центре рецептора. Теперь при облучении системы наблюдается флуоресценция, возрастающая при увеличении концентрации мальтозы. Б. Система для определения ДНК основана на методе FRET (от англ. fluorescence resonance energy transfer) – резонансной передачи энергии флуоресценции на малых (нанометровых) расстояниях. Система состоит из квантовой точки, несущей на поверхности молекулу авидина и двух ДНК-зондов, комплементарных двум различным участкам определяемой ДНК. Один из зондов конъюгирован с биотином, другой – с молекулой-флуорофором. В присутствии определяемой ДНК происходит самосборка системы; при этом наблюдается гашение флуоресценции квантовых точек вследствие передачи энергии флуорофору и количественно детектируется флуоресценция последнего. В. Система определения люциферинов основана на методе BRET (от англ. bioluminescence resonance energy transfer) – резонансной передачи энергии биолюминесценции на малых расстояниях. Энергия биолюминесценции, выделяемая при ферментативном окислении люциферина люциферазой, может вызывать флуоресценцию квантовой точки в отсутствие внешнего облучения.

точки, дающие отклик на длины волн ближнего инфракрасного спектра, можно будет выявлять опухоли, скрытые глубоко внутри тела [380]. К недостаткам квантовых точек при

медицинском применении следует отнести токсичность и короткое время циркуляции в кровотоке. Для улучшения свойств и создания возможности терапевтического применения осуществляют покрытие поверхности квантовых точек различными полимерами [210] (рис. 94). Помимо онкологии, квантовые точки с модифицированной поверхностью могут найти широкое применение в биомедицинских исследованиях в качестве биосенсоров (рис. 95).

Поскольку длина волны излучения квантовой точки располагается в узкой области спектра и квантовые точки отличаются высокой чистотой и яркостью испускаемого света при флуоресцентном излучении, они могут найти широкое применение при разработке сверхчетких дисплеев и лазеров нового поколения, быстродействующих процессоров, приборов ночного видения высокого разрешения и т.д.

Магнитные наночастицы

Помимо металлических наночастиц в настоящее время активно исследуются наночастицы, основным компонентом которых являются оксиды металлов (рис. 96) [58, 129, 202, 325]. Особый интерес вызывают магнитные наночастицы, получаемые на основе ферритов и представляющие собой сложные **оксиды железа** (например, $\text{Fe}_2\text{O}_3\cdot\text{FeO}$) [41, 242, 330]. Для исследования возможностей применения магнитных наночастиц в биомедицинских целях получают магнитные жидкости, состоящие из стабилизированных коллоидных наночастиц. В качестве дисперсной фазы в магнитных жидкостях часто используют магнетит, который отличается низкой токсичностью для организма человека. Магнетит (синоним – магнитный железняк) представляет собой минерал черного цвета состава Fe_3O_4 ($\text{Fe}_2\text{O}_3\cdot\text{FeO}$), обладающий выраженными магнитными свойствами. Важным направлением практического применения магнитных наночастиц является противоопухолевая терапия. С помощью наночастиц магнетита, входящего в состав магнитной жидкости, можно вызывать гипертермическое разрушение опухолевых клеток. При таком подходе первоначально путем пассивной, векторной или магнитоуправляемой доставки добиваются накопления необходимого количества магнитных наночастиц в зоне опухолевого роста. Затем с помощью переменного магнитного поля вызывают нагревание опухолевой ткани до 45°C , приводящее к термическому разрушению опухолевых клеток. В магнитных жидкостях, предназначенных для введения в кровь, могут использоваться магнитные наночастицы, инкапсулированные в липосомы (рис. 96). Также созданы наночастицы (размером ~ 70 нм), содержащие магнитные нанокристаллы оксида железа Fe_3O_4 , внедренные в полимерную матрицу. Такие наночастицы могут успешно доставлять противоопухолевые препараты – герцептин и доксорубин – в клетки карциномы молочной железы *in vitro*. В процессе разложения полимера химиопрепараты высвобождаются и разрушают опухолевые клетки [220].

Магнитные наночастицы природного происхождения. В настоящее время магнитные наночастицы оксидов железа Fe_2O_3 и Fe_3O_4 рассматриваются в качестве перспективных

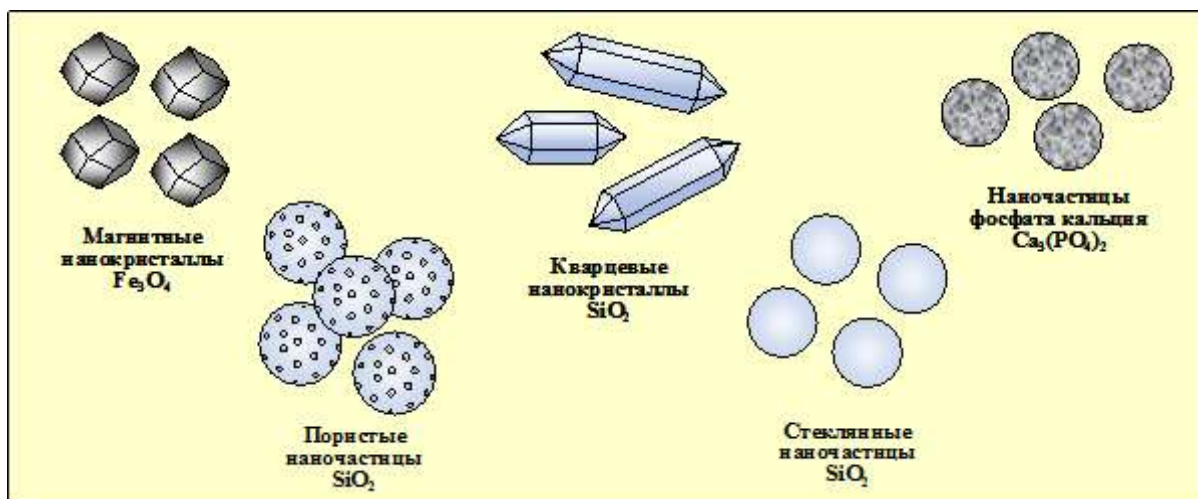


Рис. 96. Неорганические наночастицы и нанокристаллы.

компонентов диагностических и терапевтических средств нового поколения. Магнитные наночастицы широко распространены в живых организмах (бактерии, растения, животные), где они входят в состав белковых комплексов и играют важную физиологическую роль. В клетках животных и человека магнетит Fe_3O_4 и ферригидрит, или гидроксид железа $\text{FeO}(\text{OH})$, входят в состав минерального ядра цитозольного белка ферритина. Ферритин состоит из 24 субъединиц, формирующих капсулу диаметром ~ 12 нм, внутреннюю полость которой заполняет наночастица диаметром ~ 7 нм, преимущественно состоящая из ферригидрита, но также включающая феррогидрофосфат $\text{FeO}(\text{H}_2\text{PO}_4)$. В составе комплекса $[\text{FeO}(\text{OH})]_8[\text{FeO}(\text{H}_2\text{PO}_4)]$ железо присутствует в виде иона Fe^{3+} . В организме человека ферритин содержится во всех клетках и биологических жидкостях и состоит из каталитических H-субъединиц, содержащих феррооксидазные центры, и вспомогательных L-субъединиц. В клетке ферритин является главным депо железа, из которого оно высвобождается в растворимой нетоксичной и биологически активной форме. При включении в состав ферритина происходит окисление ионов железа ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$), которое осуществляется в феррооксидазных центрах H-субъединиц. При высвобождении железа из состава ферритина происходит восстановление $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$. После этого ионы Fe^{2+} выходят из ядра ферритинового комплекса и проходят через каналы белковой оболочки. В составе ферригидрита каждый ион Fe^{3+} связан координационными связями с шестью ионами O^{2-} [40]. Однако около 10% минерального ядра составляют ионы Fe^{3+} , которые связаны с пятью ионами O^{2-} и одной фосфатной группой. Фосфатные группы преимущественно локализуются на поверхности минерального ядра и осуществляют его взаимодействие с аминокислотными радикалами белковой оболочки. Считается, что восстановление железа $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ позволяет ионам Fe^{2+} покинуть пространственную решетку ферригидрита после связывания с шестью электроотрицательными атомами кислорода. В результате образуется хорошо растворимый, окруженный гидратной оболочкой ион Fe^{2+} ($\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6$) $^{2+}$, который легко проходит через каналы белковой оболочки и может быть использован для синтеза гемсодержащих

(гемоглобин, миоглобин, цитохромы митохондриальной цепи переноса электронов, цитохром P₄₅₀, участвующий в микросомальном окислении, пероксидаза, каталаза, цитохромоксидаза) и негемовых железосодержащих белков (трансферрин, ферритин, рибонуклеотидредуктаза, ксантиноксидаза, железофлавопротеины – сукцинатдегидрогеназа и NADH-дегидрогеназа).

В крови поступающие из клеток слизистой оболочки кишечника ионы железа окисляются ферментом сыворотки феррооксигеназой ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$). Транспорт ионов Fe^{3+} в крови осуществляет сывороточный белок ферритин. В тканях для синтеза железосодержащих белков используются ионы Fe^{2+} . Уровень сывороточного ферритина является показателем количества железа в организме и позволяет проводить диагностику железодефицитной анемии или анемии хронических заболеваний, сопровождающей онкологические, инфекционные и другие заболевания. У высших организмов наночастицы магнетита или ферригидрита благодаря способности к взаимодействию с магнитным полем могут играть роль компонентов биорецепторных систем, позволяющих животным определять свое местоположение относительно магнитного поля Земли, что приобретает особое значение при сезонных миграциях рыб, птиц и других животных. Бактерии, содержащие магнетит или иные формы железа (магнетобактерии), обладают свойствами магнетотаксиса, проявляющегося в способности двигаться вдоль линий магнитного поля. Способность магнетобактерий ориентироваться в магнитном поле обусловлена присутствием в их клетках магнетосом – специфических субмолекулярных структур. Считается, что благодаря магнетосомам магнетобактерии способны перемещаться к южному или северному полюсам Земли (в зависимости от полушария, в котором они находятся), а также менять свое положение в толще воды. Магнетобактерии обитают как в соленых, так и пресных водах, и в результате их жизнедеятельности образуются четыре обладающих спонтанной намагниченностью вида наночастиц, включающих магнетит Fe_3O_4 , маггемит $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, пирротин $\text{Fe}_{1-x}\text{FeS}$ ($0 < x < 0,2$) и ферригидрит $\text{FeO}(\text{OH})$ [405]. Поскольку железо составляет более 3% от сухой массы магнетобактерий, они могут рассматриваться в качестве перспективных продуцентов магнитных наночастиц для применения в области нанобиотехнологии и медицины. К бактериям, продуцирующим магнитные наночастицы, относятся микроорганизмы *Klebsiella oxytoca*, обладающие способностью к биоминерализации растворов солей железа в анаэробных условиях с образованием ферригидрита [403]. Ферригидрит образуется в результате реакции окисления поступающего из внешней среды Fe^{2+} в Fe^{3+} , которая является источником энергии для этих бактерий. Бактерии *Klebsiella oxytoca* могут рассматриваться в качестве потенциального промышленного источника получения магнитных наночастиц, поскольку они легко размножаются в лабораторных условиях и накапливают значительные количества ферригидрита. Культивирование бактерий в средах, содержащих помимо Fe^{2+} ионы таких металлов, как Al, Cd, Co, Cr, Ni, а также Mn, может позволить получать легированные наночастицы ферригидрита с различными магнитными характеристиками, расширяющими возможности их применения в нанобиотехнологии. Представляется очевидным, что

разработка биологических методов получения наночастиц является одним из интереснейших и перспективных направлений развития нанобиотехнологии, которое, однако, находится в стадии становления.

Наночастицы оксидов цинка, титана, церия и кремния

Помимо оксидов железа для получения наночастиц используют оксиды цинка ZnO и титана TiO_2 . Эти оксиды применяются в качестве антисептиков в зубной пасте и различных косметических средствах. Благодаря фотокаталитической активности и способности к поглощению света в УФ-диапазоне частицы, включающие ZnO и TiO_2 используются в солнцезащитных кремах [298]. Нанокристаллы диоксида церия CeO_2 применяются в качестве катализатора и добавляются в виде присадок к топливу для дизельных двигателей. Применение нанокристаллов резко повышает эффективность сгорания топлива и уменьшает вредные выбросы в атмосферу.

Так же, как и оксиды металлов, для получения наночастиц широко применяют оксид кремния SiO_2 , из которого могут быть изготовлены кварцевые нанокристаллы, стеклянные и пористые наночастицы (рис. 96).

Наночастицы фосфата кальция

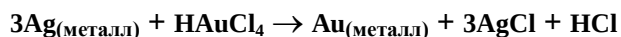
Одним из наиболее перспективных материалов для получения неорганических наночастиц является фосфат кальция $Ca_3(PO_4)_2$ (рис. 96). Фосфат кальция – безопасный минерал, присутствующий в крови здорового человека в довольно значительных количествах. Размер наночастиц фосфата кальция, применяемых в биомедицинских исследованиях, составляет ~50 нм, и эти наночастицы могут быть нагружены различными терапевтическими агентами, в частности, противоопухолевыми химиопрепаратами [9, 48, 194]. Такие наночастицы проникают в опухолевые клетки, постепенно растворяются, а высвобождающиеся химиопрепараты оказывают терапевтическое действие. Поскольку во внеклеточном пространстве опухолевой ткани обычно поддерживается низкий уровень pH (кислая среда), наночастицы фосфата кальция растворяются и там, высвобождая химиопрепарат, действующий на окружающие опухолевые клетки. Помимо фосфата кальция, в настоящее время активно разрабатываются наночастицы на основе редкоземельных фосфатов, например, фосфатов лантаноидов. Из фосфатов лантаноидов изготавливают нанолюминофоры, которые могут найти применение в диагностических системах, а также оказаться полезными для обеспечения безопасности денежных знаков.

Наноклетки и нанораковины

Наноклетки (от англ. nanocages) представляют собой построенные из благородных металлов полые структуры кубической формы с пористыми стенками (рис. 97). Примером таких структур могут служить золотые наноклетки, которые получают с помощью реакции простого гальванического замещения в растворе, содержащем соль золота и

суспендированные кубические наночастицы серебра [314]. Метод получения наноклеток отличается простотой и оригинальностью и поэтому заслуживает более подробного описания.

На первом этапе путем восстановления нитрата серебра этиленгликолем при 148°C в присутствии поливинилпирролидона и следовых количеств хлорида натрия получают наночастицы размером 20-80 нм, которые представляют собой одиночные кристаллы металлического серебра кубической формы. Затем для получения золотых наноклеток проводят реакцию гальванического замещения в растворе золотохлористоводородной кислоты HAuCl_4 , содержащем суспендированные серебряные нанокубы. Движущей силой реакции окисления Ag и восстановления Au является различие восстановительных потенциалов этих металлов. Чем больше стандартный восстановительный потенциал металла, тем легче его можно восстановить и тем более сильным окислителем он является. Сильные восстановители отличаются большими отрицательными восстановительными потенциалами. Определенный относительно стандартного водородного электрода восстановительный потенциал $\text{AuCl}_4^-/\text{Au}$ (0,99 В) больше потенциала AgCl/Ag (0,22 В), поэтому в реакции гальванического замещения золото будет восстанавливаться, а серебро окисляться:



Матрицей для формирования золотых наноклеток служат серебряные нанокубы. В ходе окислительно-восстановительной реакции металлическое золото откладывается на поверхности серебряного куба, постепенно замещая серебро, переходящее в раствор в виде ионов Ag^+ . Во многих местах внутреннего объема куба серебро также растворяется и замещается металлическим золотом, в результате чего и формируются золотые пористые кубические структуры, названные наноклетками (рис. 97 А). В принципе подобный процесс образования наноклеток на матрице серебряных кубических наночастиц может проводиться и с использованием других металлов при условии, что их стандартный восстановительный потенциал будет больше потенциала пары AgCl/Ag . Например, на основе матриц из серебряных наночастиц в растворах солей Na_2PtCl_4 и Na_2PdCl_4 получают пористые наноструктуры из платины и палладия [313, 314].

С помощью описанного выше метода восстановления нитрата серебра могут быть получены различные серебряные наноматрицы (кубы, шары, призмы, кольца, проволока, трубки и др.), на основе которых получают наноклетки в форме кубов и тетраэдров (нанопризмы) с усеченными вершинами, нанорамки (рис. 97 Б), нанокольца, нанотрубки, многослойные нанораквины и др.

Состав, размеры пор, характер пористости, а, следовательно, и свойства наноклеток могут быть модифицированы посредством манипуляций составом реакционной среды и количеством HAuCl_4 (Na_2PtCl_4 , Na_2PdCl_4), добавляемой к суспензии серебряных наночастиц. Это создает широкие возможности для получения самых разнообразных наноклеток (и других подобных наноструктур), которые могут найти применение в области нанотехнологии, химии (катализа) и медицины. В медицине наноклетки могут быть



Рис. 97. Получение наноклеток различных типов с помощью реакции гальванического замещения. А. Схематическое изображение процесса получения наноклеток, основанного на реакции гальванического замещения. Матрицей для формирования золотых наноклеток служат серебряные нанокубы. В ходе окислительно-восстановительной реакции металлическое золото откладывается на поверхности серебряного куба, постепенно замещая серебро, переходящее в раствор в виде ионов. Во многих местах внутреннего объема куба серебро также растворяется и замещается металлическим золотом, в результате чего формируются золотые пористые кубические структуры. Б. Различные типы золотых наноклеток. Наноклетки тетраэдрической формы получают из серебряных тетраэдрических наночастиц. С помощью метода гальванического замещения и с использованием в качестве матриц серебряных наночастиц могут быть также получены наноклетки из платины и палладия.

использованы в качестве контрастирующих агентов, усиливающих качество изображения при проведении оптической когерентной и фотоакустической томографии.

Наиболее активно наноклетки исследуются в качестве средства повышения чувствительности фотоакустической томографии, применяемой для изучения органов и тканей, а также ранней диагностики онкологических заболеваний [46]. В основе фотоакустической томографии лежит преобразование светового излучения в звуковые волны. Применение ближнего инфракрасного света позволяет рассматривать ткани на глубине ~ 5 см при условии использования контрастирующих агентов, в качестве которых могут выступать наноклетки и другие виды наночастиц. С помощью наноклеток можно с успехом проводить раннюю диагностику различных онкологических заболеваний, включая опухолевые поражения головного мозга. Наноклетки не могут проникать в здоровую ткань мозга, защищаемую гематоэнцефалическим барьером, однако вследствие повышенной проницаемости опухолевых кровеносных сосудов наночастицы все же проникают и

накапливаются в опухолевой ткани. В результате место локализации опухоли может быть быстро установлено с помощью фотоакустической томографии.

Наноклетки с модифицированной полимерами поверхностью могут также применяться в качестве носителей противоопухолевых агентов в составе препаратов направленного действия. Модификация поверхности наноклеток полимерами (например, полиэтиленгликолем ПЭГ 5000) снижает их токсичность для организма, препятствует поглощению макрофагами и значительно увеличивает время циркуляции в крови. Кроме того, к полимеру могут присоединяться векторные компоненты (антитела, цитокины и др.), позволяющие адресно доставлять наноклетки, несущие терапевтический агент, в опухолевые клетки. Наноклетки с модифицированной поверхностью могут быть также использованы в качестве компонентов противоопухолевых препаратов направленного действия, вызывающих избирательное гипертермическое разрушение опухолевых клеток при их облучении светом определенной длины волны.

Очевидно, что области применения наноклеток могут быть значительно шире, однако для их определения необходимо объединение усилий ученых, работающих в различных областях прикладных и фундаментальных наук.

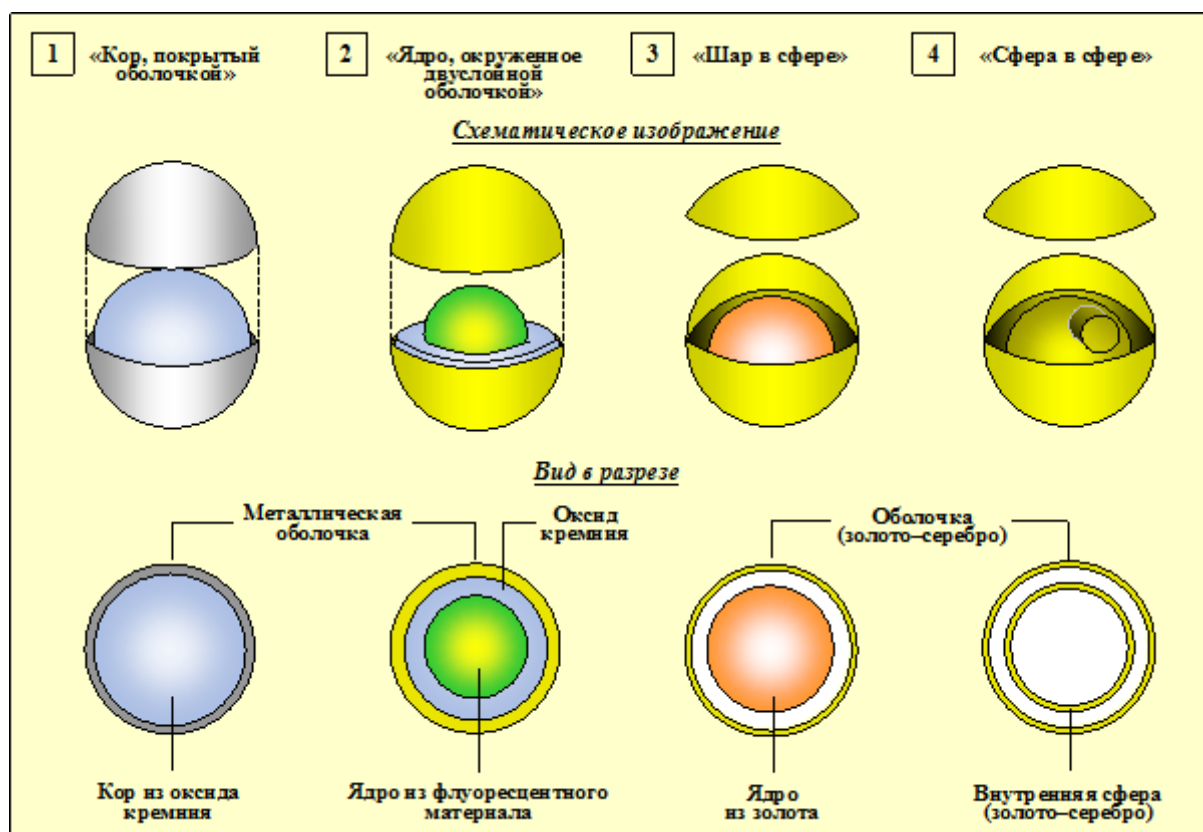


Рис. 98. Различные типы нанораковин. 1. Сферические наночастицы, состоящие из оксида кремния и покрытые снаружи металлической оболочкой. 2. Нанораковины, включающие ядро из флуоресцентного материала, окруженное кремниевой (SiO_2) оболочкой, покрытой снаружи слоем золота. 3, 4. Нанораковины типа «шар в сфере» и «сфера в сфере» («нанопогремушки»). Оболочки таких нанораковин могут вместо золота включать платину или палладий.

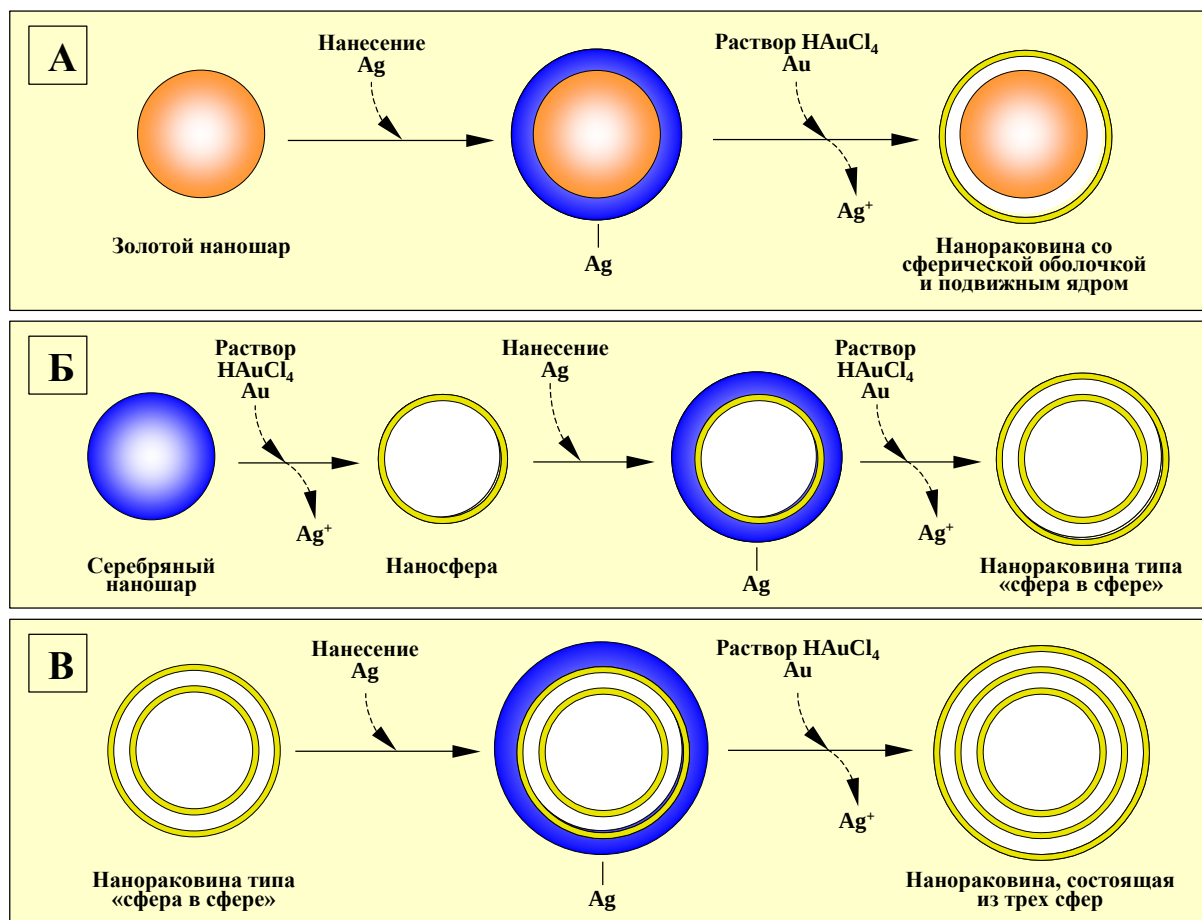


Рис. 99. Схематическое изображение этапов получения многослойных нанораковин. Подобно золотым наноклеткам, получаемым в реакции гальванического замещения серебра на золото с использованием в качестве матрицы серебряных нанокубов можно получать и нанораковины. Многослойные нанораковины получают и использованием в качестве матриц серебряных или золотых шаров. А. Получение нанораковин со сферической оболочкой и подвижным ядром («нанопогремушек»). На золотые наночастицы с помощью электрохимических методов наносят слой металлического серебра (1). Для проведения реакции гальванического замещения наночастицы помещают в раствор HAuCl_4 (2). В ходе окислительно-восстановительной реакции Ag переходит в раствор и постепенно замещается на Au . В результате вокруг золотого ядра формируется сферическая оболочка, состоящая преимущественно из Au (неполное замещение Ag). Б. Получение нанораковин типа «сфера в сфере». Серебряные наночастицы помещают в раствор HAuCl_4 (1). В результате замещения Ag на Au образуются полые сферические наночастицы, состоящие из Au/Ag , которые снаружи покрывают слоем серебра (2). Полученные наночастицы помещают в раствор HAuCl_4 (3). В результате замещения Ag на Au образуются нанораковины типа «сфера в сфере». В. Нанораковины, включающие три и более сферы («маноматрешки»), получают из двуслойных, чередуя стадии покрытия серебром и гальванического замещения Ag на Au .

Нанораковины (от англ. *nanoshells*) представляют собой наночастицы размером 100–200 нм, состоящие из кремниевого кора, покрытого металлической оболочкой (рис. 98). Изменяя толщину оболочки и объем кора, можно точно «настраивать» нанораковины на поглощение или рассеяние света определенной длины волны [314]. Для медицинского

применения особенно важным является получение нанораковин с высокой абсорбцией излучения ближней инфракрасной области спектра. Такие инфракрасные волны отличаются низкой абсорбцией тканями человека, что создает благоприятные условия для применения нанораковин в целях разрушения опухолевых клеток. При использовании такого подхода к терапии пациенту вводят препарат нанораковин в кровь и после завершения накопления частиц в опухолевой ткани производят облучение места локализации опухоли инфракрасным светом. Ткани организма свободно пропускают инфракрасные лучи, а нанораквины, напротив, поглощают их, разогреваются и вызывают термическое разрушение опухоли. В настоящее время созданы также температурно-чувствительные нанораквины, несущие химиопрепараты. При облучении таких нанораковин, локализованных в опухолевой ткани, происходит высвобождение химиопрепарата, оказывающего поражающее действие на опухолевые клетки. Высвобождение терапевтического агента из нанораковин также может быть вызвано изменением магнитного поля. Для обеспечения выведения нанораковин через почки из организма очень важное значение приобретает их размер, поскольку частицы с диаметром, превышающим 6 нм, могут не пройти через систему почечной фильтрации.

Описаны разновидности нанораковин, представляющие собой структуры типа «шар в сфере» или «сфера в сфере», которые называют «нанопогремушками» (англ. nanorattles) (рис. 98, 99). В первом случае ядро частицы состоит из золота, наружная сфера – из сплава золота и серебра; во втором – обе сферы состоят из сплава золота и серебра.

Фуллерены и нанотрубки

Углерод образует несколько разных модификаций твердой фазы – алмаз, графит, фуллерены, нанотрубки и др. (рис. 100). Несмотря на то, что все перечисленные материалы построены исключительно из атомов углерода, они резко отличаются по физическим свойствам, что обусловлено различными типами упорядочения атомов в кристаллических решетках. Наночастицы различных форм углерода широко исследуются на предмет выявления возможности их применения в биомедицинских целях.

Алмаз отличается уникальной структурой, обеспечивающей его чрезвычайно высокую прочность (рис. 100 А). Структура алмаза близка к структурам германия и кремния. В кристаллической решетке алмаза каждый атом углерода связан с четырьмя ближайшими атомами. В отличие от полупроводников германия и кремния, алмаз относится к классу изоляторов.

В слоистой структуре графита каждый атом углерода связан с тремя соседними атомами (рис. 100 Б). Благодаря этой особенности структуры графит отличается механической мягкостью и высокой электрической проводимостью.

Фуллерены представляют собой сферические углеродные частицы различных размеров. Кристаллическая поверхность самого маленького фуллерена C_{60} состоит из атомов углерода, объединенных в пяти- и шестиугольники (рис. 100 В). Фуллерен C_{60} содержит 60 атомов углерода, упорядоченных в виде 12 пяти- и 20 шестиугольников, формирующих сферическую поверхность [24]. Название фуллеренов происходит от фамилии архитектора

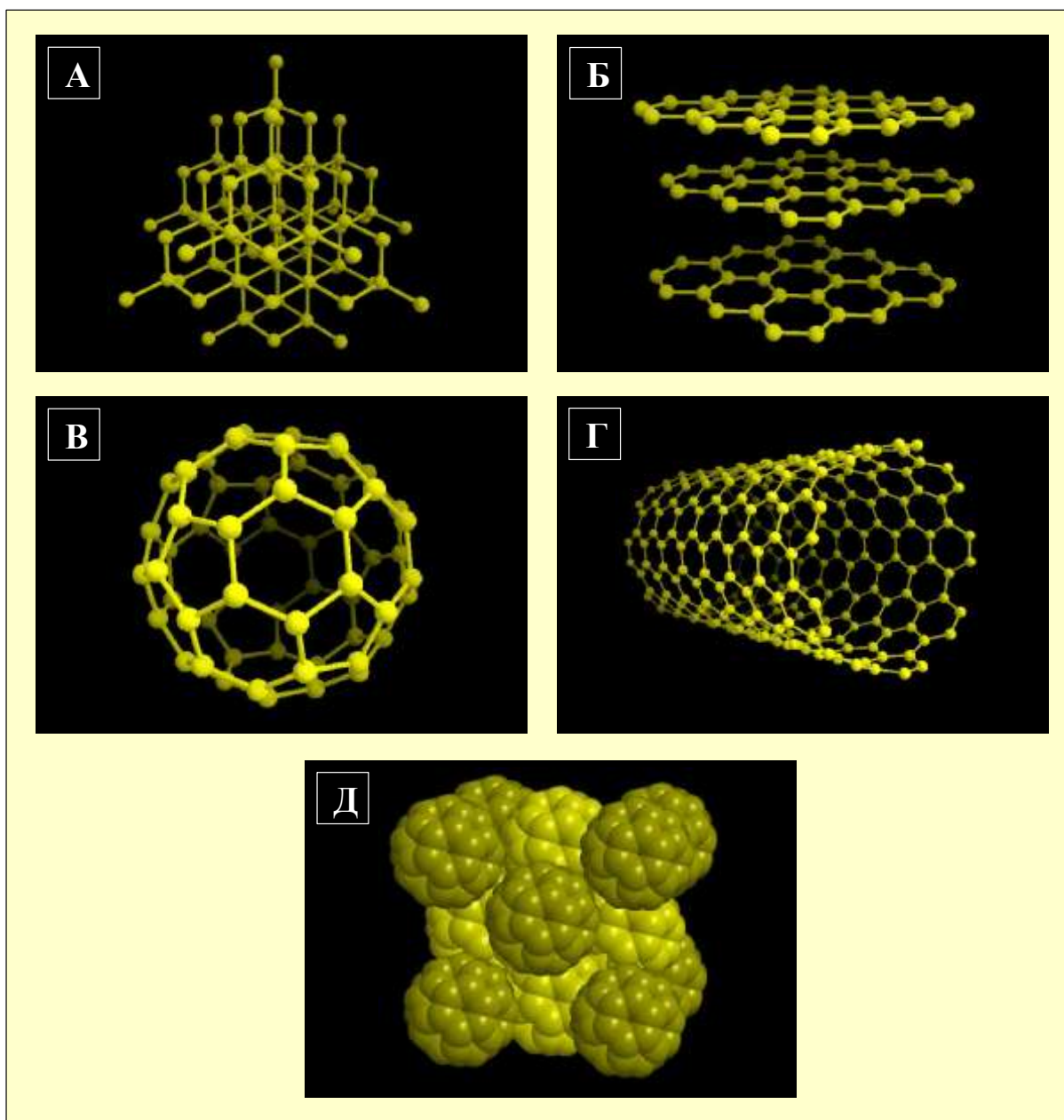


Рис. 100. Схематические изображения структуры алмаза (А), графита (Б), фуллерена C_{60} (В), углеродной нанотрубки (Г) и кристалла, состоящего из молекул фуллерена C_{60} (Д).

Ричарда Фуллера, который использовал полиэдрические конструкции для создания куполов зданий. За открытие фуллеренов как новой формы существования углерода ученые Р. Керл, Р. Смолли и Г. Крото в 1996 г. были удостоены Нобелевской премии по химии. Помимо фуллерена C_{60} существует множество более крупных фуллеренов – C_{70} , C_{82} , C_{84} , ... C_{240} ... В настоящее время синтезированы тысячи фуллеренов более сложного типа, среди которых нанотрубки являются наиболее широко исследуемыми объектами биомедицинских технологий. Нанотрубки были впервые обнаружены в 1952 г. советскими учеными Л.В. Радushкевичем и В.М. Лукьяновичем в саже электродуговых свеч. В лексикон ученых термин «нанотрубка» вошел после публикации в 1991 г. одной из работ японского ученого

Сумио Иидзими [134]. Фуллерены могут быть получены в процессе горения, при помощи лазерной абляции (абляция – процесс уноса вещества с поверхности твердого тела под воздействием излучения). При промышленном производстве фуллерены получают термическим распылением сажи в атмосфере инертного газа в присутствии катализаторов. Фуллерены входят в состав природного минерала шунгита, которому приписываются целебные свойства. Шунгит представляет собой минерал черного цвета, содержащий помимо углерода оксиды титана, алюминия, железа, магния, калия, а также серу. Залежи шунгита образовались из осадочных морских отложений, содержащих много органических веществ и примитивных микроорганизмов, живших на Земле около двух миллиардов лет назад. Единственное промышленное месторождение шунгита находится в Карелии. Шунгит хорошо проводит ток и, в отличие от каменного угля, не обладает выраженным блеском и не используется в качестве топлива. Шунгит применяется в качестве наполнителя в промышленных и бытовых водоочистительных фильтрах, в доменном производстве чугуна, производстве ферросплавов, в качестве наполнителя термостойких красок и полимерных материалов, при производстве электропроводных материалов, лечебных мазей, приспособлений для массажа и т.д. Свойства шунгита во многом определяются входящими в его состав фуллеренами.

В настоящее время проводятся активные исследования, направленные на разработку стратегий применения фуллеренов в нанобиотехнологии, биологии и медицине. Необходимо отметить, что наночастицы фуллеренов при применении в биологических системах могут проявлять токсические свойства. Имеются указания на участие наночастиц фуллерена C_{60} в окислительном разрушении липидов и повреждении нуклеиновых кислот в клетках. В то же время фуллерены способны к связыванию и нейтрализации свободных радикалов, оказывающих разрушающее действие на клетки. Для снижения токсичности и увеличения растворимости фуллеренов производят их химические модификации, позволяющие вводить в состав фуллеренов гидрофильные функциональные молекулы. Введение в состав фуллеренов гидроксильных или карбоксильных групп позволяет значительно увеличить их гидрофильность и снизить токсичность. Так, введение 24 гидроксильных групп в состав фуллерена C_{60} позволяет получить препарат ($C_{60}(OH)_{24}$), не проявляющий токсичности даже при введении в кровь лабораторным животным в высоких дозах [331]. Модифицированные фуллерены могут успешно применяться для терапии онкологических заболеваний. Так, нитроксидные метанофуллерены в комбинации с циклофосфамидом проявляют высокую противоопухолевую активность в отношении клеток лейкемии. Также получены ковалентные и нековалентные соединения фуллеренов с порфиринами, проявляющими противоопухолевую активность, однако для определения конкретных направлений медицинского применения таких соединений требуются дополнительные исследования [6, 165]. Применение в медицине могут найти и нековалентные комплексы фуллеренов с различными биосовместимыми полимерами (поливинилпирролидоном, полиэтиленгликолем и др.) [260]. Присоединение к поверхности фуллеренов антител и векторных белков позволит осуществлять адресную доставку лекарственных препаратов к клеткам-мишеням.

Важным направлением работы с фуллеренами является создание технологий, позволяющих заполнять их внутреннее пространство различными атомами, радионуклидами и молекулами химиопрепаратов [18]. Такие «нагруженные» терапевтическими агентами фуллерены могут найти широкое применение в медицине.

Нанотехнологии позволяют формировать из отдельных фуллеренов кристаллические структуры (рис. 100 Д), в состав которых могут быть введены химиопрепараты, антибиотики и биологически активные фенольные соединения растительного происхождения. При условии модификации поверхности таких нанокристаллов гидрофильными группами или биосовместимыми полимерами они также, как и индивидуальные фуллерены, могут успешно применяться в медицине [260]. Присутствие посторонних веществ в составе фуллереновых кристаллов нередко приводит к резкому изменению их свойств. Так, введение в кристалл алкалоидов, осуществляемое путем легирования, придает фуллереновым кристаллическим структурам свойство сверхпроводимости, заключающееся в практически полном отсутствии электрического сопротивления при низких температурах. Такие структуры и полученные на их основе материалы могут найти применение в различных областях науки и техники.

Углеродные нанотрубки представляют собой полые цилиндры, поверхность которых состоит из правильных шестиугольников, сформированных атомами углерода (рис. 100 Г). Углеродные нанотрубки не растворимы в биологических жидкостях и проявляют токсические свойства. Для создания условий биомедицинского применения углеродных нанотрубок производят различные химические модификации их поверхности, приводящие к увеличению растворимости и снижению токсичности. Углеродные нанотрубки могут быть использованы для транспорта различных терапевтических агентов (пептидов, белков, нуклеиновых кислот, химиопрепаратов и др.) [114, 253, 332]. Модификация поверхности нанотрубок антителами и векторными молекулами позволяет создавать системы, осуществляющие направленную доставку терапевтических агентов к определенным тканям. В настоящее время ведутся исследования возможностей терапевтического применения нанотрубок, ковалентно связанных с противогрибковым антибиотиком амфотерицином В и противоопухолевым химиопрепаратом метотрексатом [271, 377]. Американским ученым удалось ввести внутрь углеродных нанотрубок радионуклид астат $^{211}_{85}\text{At}$, получаемый на ускорителях путем облучения α -частицами висмута или тория [126]. Астат $^{211}_{85}\text{At}$ обладает коротким периодом полураспада (~ 7 ч) и эффективно поражает опухолевые клетки. Модифицированные антителами (направленными против опухолевого антигена) углеродные нанотрубки, несущие $^{211}_{85}\text{At}$ или другие радионуклиды, могут адресно доставлять их к раковым клеткам. Благодаря сродству к липидным структурам (биомембранам) и способности образовывать стабильные комплексы с пептидами и ДНК углеродные нанотрубки также могут найти применение в медицине в качестве транспортных частиц, осуществляющих доставку генетического материала и различных вакцин.

Углеродные нанотрубки с высокой эффективностью люминесценции, например, полученные путем покрытия их поверхности производным рибофлавина (витамина В2),

могут найти применение в медицине в качестве маркеров для диагностики онкологических заболеваний, контрастирующих веществ, улучшающих изображение тканей, а также для производства элементов оптических световодов, наноразмерных фотодатчиков, светодиодов и др.

В настоящее время продолжают интенсивные поиски методов получения новых форм фуллеренов и возможностей их применения в различных областях деятельности человека. Поскольку нанопрепараты, получаемые на основе углерода, могут отличаться новыми малоизученными физико-химическими и биологическими свойствами, для обеспечения безопасности их применения необходим широкий спектр медико-биологических исследований.

Методы получения наночастиц

Помимо уже рассмотренных в общем виде подходов к получению наночастиц и наноматериалов в настоящее время широко применяются следующие методы:

- золь-гельный (позволяет получать аэро- и ксерогели, наноматериалы на основе оксидов кремния и титана, различные нанокомпозиты и др.);
- кристаллизации в жидких средах (получение нанокристаллов контролируемого размера);
- синтез в сверхкритических жидкостях (гидро- и сольвотермальный синтез наночастиц цеолитов, полупроводников, металлов и их оксидов и др.);
- синтез путем осаждения (позволяет получать наночастицы золота, серебра, платины и других металлов в форме, кубов, призм, стержней и т.п.; магнитные жидкости; наночастицы полупроводников; металлические наночастицы, состоящие из ядра и оболочки; наночастицы, включающие ядро оксида кремния, покрытое слоем металла и др.);
- синтез при физическом воздействии на реакционную среду (получение наночастиц с использованием микроволнового, ультразвукового воздействия, а также ультрафиолетового, рентгеновского и радиоактивного излучения);
- синтез при мокром сжигании (наночастицы образуются при распылении жидкостей в пламени);
- криохимического синтеза (наночастицы образуются после замораживания реакционной смеси и удаления растворителя);
- матричного, или темплатного, синтеза (позволяет осуществлять синтез наночастиц в микроэмульсиях и мицеллах; этим способом получают мезопористые силикаты, дендримеры, нанокомпозиты);
- электрохимического синтеза (процессы, происходящие на катоде и аноде, позволяют получать нанопористые материалы, наноструктурированные покрытия, прочные покрытия, состоящие из металла и наночастиц, полученные путем

электроосаждения и др.);

- самоорганизации наночастиц под действием электромагнитных полей, гравитационных, капиллярных, центробежных и других сил (позволяет получать плоские и объемные упорядоченные наноструктуры).

Представленный список отражает лишь часть методов получения наночастиц и наноматериалов. В настоящее время с быстрым развитием нанотехнологии постоянно разрабатываются новые методы получения наночастиц и наноматериалов и совершенствуются уже существующие.

Биочипы – назначение и принципы функционирования

Одним из интереснейших направлений развития нанобиотехнологии является разработка биочипов (биологических микрочипов). Биочипы были изобретены в конце 80-х годов прошлого столетия в США и России и являются продуктом высоких технологий. Биологические микрочипы представляют собой миниатюрные приборы для параллельного анализа специфических взаимодействий биологических макромолекул. Биочипы находят применение в фундаментальных молекулярно-биологических и эволюционных исследованиях, а также в экологии, фармакологии и различных областях медицины [79, 84, 199].

Типичный биочип представляет собой стеклянную, металлическую, кремниевую или пластиковую пластину (платформу), на которой в ячейках или каплях полиакриламидного геля диаметром 150 мкм иммобилизованы различные молекулярные зонды (олигонуклеотиды, фрагменты геномной ДНК, РНК, белковые лиганды, рецепторы, антитела и т.п.). Средний линейный размер биочипа составляет около 1 см, при этом на нем размещается более 100 тысяч ячеек размером 50-200 мкм и объемом от 1 нл до 1 мкл. Концентрации анализируемых макромолекул обычно находятся в пределах от 1 пМ до 10 мкМ. Иммобилизуемая ДНК (или белок) наносится на поверхность ячейки (или капли) механическим роботом через специальные игольчатые растры (пины) или с помощью технологии «струйного принтера». Анализируемые вещества (предварительно помеченные флуоресцентным красителем), обладающие специфическим сродством к зондам, добавляют в ячейки биочипа и после отмывки несвязавшегося материала считывают информацию с помощью флуоресцентного микроскопа или лазерного сканирующего устройства. Полученные данные обрабатываются с использованием специальных компьютерных программ. Существуют оригинальные конструкции биочипов, позволяющие выявлять патогенные микроорганизмы (рис. 101).

Изготовление биочипов – сложный технологический процесс, предъявляющий высокие требования к степени чистоты, запыленности, влажности помещения и оборудования, а также требующий высококвалифицированного персонала. В настоящее время биочипы производятся рядом американских биотехнологических компаний – «Affymetrix», «Incyte Genomics», «Nanogen» и др. В России основоположниками и главными

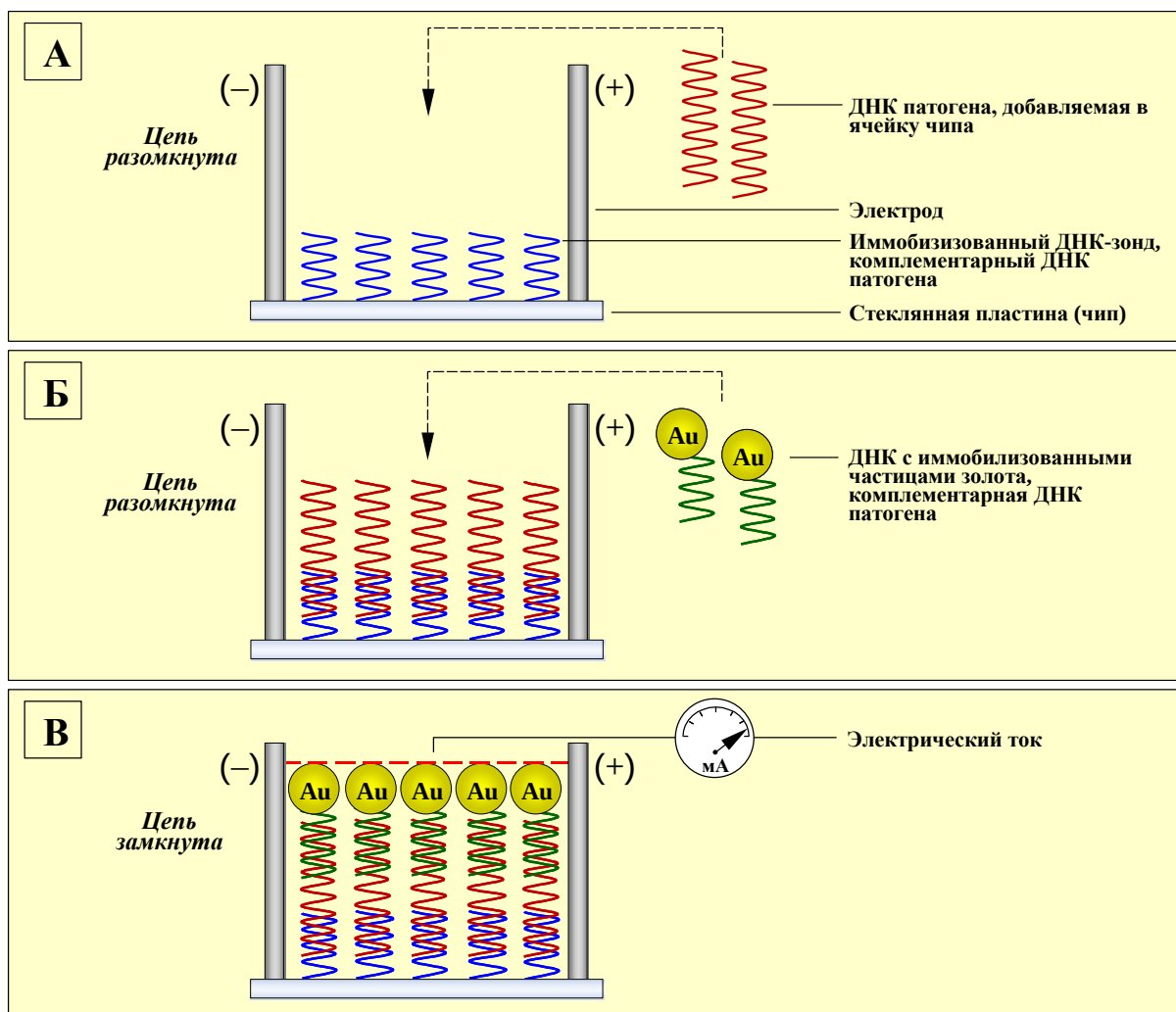


Рис. 101. Схематическое изображение конструкции и принципа работы микробичипа для определения патогенной микрофлоры. А. В лунку с ДНК-зондом, иммобилизованной между электродами на стеклнной пластине (чипе) добавляют анализируемый образец, содержащий ДНК патогена. Б. После гибридизации комплементарных цепей ДНК в лунку добавляют ДНК, меченную частицами золота и комплементарную ДНК патогена. В. Связывание меченой ДНК приводит к замыканию электрической цепи. Возникающий ток регистрируется специальным детектором, и результат выдается в виде положительного ответа на присутствие в пробе патогенного микроорганизма.

производителями биочипов являются лаборатория биологических микрочипов Института молекулярной биологии РАН и научно-производственная компания «БИОЧИП-ИМБ».

Биочипы отличаются высокой емкостью для образцов при минимальном размере, возможностью иммобилизации на платформе биочипа десятков и сотен тысяч химических и биологических зондов, возможностью одновременного анализа препарата по целому ряду показателей, скоростью и высокой степенью автоматизации процесса анализа и обработки его результатов [214].

Области применения биочипов достаточно широки и охватывают:

- поиск и установление функций различных генов;
- одновременный анализ десятков тысяч генов и сравнение их экспрессии в норме и при патологии;
- исследование лиганд-рецепторных взаимодействий;
- исследование механизмов действия новых лекарственных препаратов;
- дифференциальную диагностику онкологических заболеваний;
- диагностику инфекционных заболеваний (СПИД, гепатит, сифилис и т.п.);
- экспресс-анализы на наличие болезнетворных микробов в окружающей среде;
- выявление токсинов, тяжелых металлов и др.

Биочипы могут применяться как для исследования фундаментальных научных проблем молекулярной биологии, генетики, биохимии, эволюционной теории, так и для решения прикладных задач в биотехнологии, микробиологии, медицине, фармакологии, экологии, судебно-медицинской экспертизе и т.д.

Безусловно, разработка широкого спектра диагностических биологических микрочипов является одним из важнейших и быстроразвивающихся направлений нанобиотехнологии, однако широкое применение биочипов ограничивается высокой капиталоемкостью производства и стоимостью тест-систем, необходимостью привлечения квалифицированного обслуживающего персонала, использования дорогостоящего оборудования и специального программного обеспечения. Организация научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ по созданию новых биочипов также требует существенных финансовых затрат.

Перспективы развития медицинской нанобиотехнологии

Сегодня нанобиотехнология переживает бурное развитие не только в развитых индустриальных державах, таких как США и Япония, но и во многих других странах. Одной из важнейших областей, остро нуждающихся в разработке и скорейшем внедрении нанобиотехнологических инноваций, является медицина. В области медицины методы нанобиотехнологии широко применяются для создания средств адресной доставки биологически активных веществ, терапевтических агентов и изотопов к тканям-мишеням, на основе которых получают противоопухолевые, противомикробные и противогрибковые препараты, вакцины, препараты для введения генетического материала в клетки, антиангиогенные препараты и т.д. Методы нанобиотехнологии также активно применяются для создания различных диагностических и аналитических систем, среди которых особое место занимают биочипы, отличающиеся высокой скоростью и чувствительностью анализа. Широкое применение методов нанобиотехнологии для создания препаратов направленного действия, аналитических и диагностических систем уже в ближайшей перспективе позволит не только значительно повысить уровень биомедицинских исследований, но и осуществлять раннюю диагностику и эффективное лечение различных заболеваний. Полученные с

помощью нанотехнологий рентгеноконтрастные вещества, радиоактивные, люминесцентные, термо- и pH-чувствительные метки в скором времени позволят осуществлять высококачественную визуализацию органов и сосудов, а также раннюю и более эффективную диагностику различных патологий. Использование нанотехнологий позволит также значительно увеличить растворимость и биодоступность многих биологически активных компонентов лекарственных растений. Эта важная задача может быть решена как путем введения этих активных компонентов в состав различных наночастиц, так и путем создания наночастиц самих активных компонентов. Применение данного подхода уже в ближайшее время позволит создать широкий спектр новых терапевтических препаратов, отличающихся высокой эффективностью действия. Следует учитывать, что бурное развитие нанобиотехнологии приводит к разработке все новых и новых препаратов, в связи с чем особое значение приобретает необходимость всестороннего изучения вопросов, касающихся безопасности применения наночастиц в медицинской практике.

Важным направлением развития нанобиотехнологии является создание биоматериалов и имплантатов. Для получения последних уже сегодня применяются нанокристаллические материалы и покрытия. Помимо покрытия поверхности имплантатов слоем кристаллов гидроксиапатита, большие перспективы сулит применение нанокристаллического алмазного покрытия, которое может способствовать значительному увеличению прочности и продолжительности срока функционирования имплантатов. Алмазные покрытия отличаются высокой биосовместимостью, и остеобласты способны успешно распознавать такой имплантат и закрепляться на его алмазной поверхности.

Для создания искусственных тканей и органов средствами нанотехнологии получают различные нановолокна. Например, для создания искусственной мышечной ткани применяют углеродные нанотрубки. Искусственные мышцы представляют собой пластины аэрогеля – твердотельного материала очень низкой плотности, содержащего структурированные углеродные нанотрубки. При приложении напряжения к искусственной мышце нанотрубки начинают отталкиваться друг от друга, создавая эффект растяжения. Растяжимость искусственных мышц в 10 раз превышает растяжимость мышц человека, а скорость их растяжения в 1000 раз выше скорости растяжения мышц человека. При сжатии искусственные мышцы развивают силу, в десятки раз превосходящую силу мышц человека. В перспективе с помощью наноматериалов будут создаваться не только искусственные мышцы, но и органы, способные замещать утраченные или поврежденные органы человека.

Таким образом, в настоящее время закладываются основы широкого применения нанотехнологий во всех областях медицины. Очевидно, что развитие нанотехнологии и молекулярной медицины уже в ближайшем будущем приведет к значительному повышению эффективности диагностики и лечения широкого спектра заболеваний, однако для этого потребуются большие затраты финансов и усилий специалистов, работающих в различных областях прикладных и фундаментальных наук.

НАНОПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

Главной проблемой химиотерапии онкологических заболеваний является ее низкая эффективность, которая связана прежде всего с отсутствием избирательности действия, высокой токсичностью, многочисленными побочными эффектами и множественной лекарственной устойчивостью опухолевых клеток к химиопрепаратам. Для решения этой проблемы многими научно-исследовательскими коллективами были предприняты попытки адресно доставлять химиопрепараты в клетки-мишени в виде конъюгатов с антителами против поверхностноклеточных опухолевых антигенов. Однако использование антител в качестве векторных молекул не всегда приносит ожидаемые практические результаты из-за низкой эффективности их интернализации и иммунных реакций. В ряде случаев преодоление этого затруднения может быть достигнуто при использовании в качестве векторных молекул физиологических лигандов, имеющих рецепторы на поверхности опухолевых клеток, – факторов роста, цитокинов, онкофетальных белков, трансферрина, альбумина и др. Различные химиопрепараты могут быть химически присоединены к векторной молекуле и доставлены в опухолевую клетку путем рецепторопосредованного эндоцитоза. В отличие от антител, использование цитокинов в качестве векторных молекул бывает более предпочтительным, поскольку они отличаются небольшой молекулярной массой, стабильностью и высокой эффективностью интернализации.

Среди цитокинов эпидермальный фактор роста (ЭФР) является одним из наиболее перспективных факторов роста, которые могут использоваться в качестве векторных компонентов таких наноразмерных транспортных систем, как конъюгаты (с химиопрепаратами, токсинами, антисмысловыми олигонуклеотидными последовательностями, антиангиогенными агентами, биофлавоноидами и др.) и различные виды «нацеленных» наночастиц (липосомы, мицеллы, нанопузырьки, фуллерены, нанотрубки, нанораковины, кубосомы, магнитные частицы и др.). К важнейшим преимуществам использования ЭФР в качестве векторной молекулы относятся его высокая стабильность, доступность в виде рекомбинантного белка, высокая эффективность интернализации лиганд-рецепторных комплексов. Решающее значение имеет также аномально высокий уровень экспрессии рецептора ЭФР на поверхности опухолевых клеток по сравнению с нормальными, создающий возможность их избирательного поражения с помощью препаратов направленного действия.

Подходы к блокированию ЭФР-зависимой активации опухолевого роста

Гиперэкспрессия рецепторов семейства ЭФР и их лигандов наблюдается в таких типах опухолей, как глиомы, рак молочной и поджелудочной желез, печени и многих других. Часто гиперэкспрессия рецептора ЭФР является прогностическим фактором, указывающим на высокую биологическую агрессивность опухоли и неблагоприятный прогноз в отношении исхода онкологического заболевания (табл. 13). При ряде онкологических заболеваний также наблюдается значительное повышение концентрации ЭФР в моче, что позволяет

рассматривать данный белок в качестве опухолевого маркера при диагностике рака.

Рецептор ЭФР играет важную роль не только в регуляции пролиферации нормальных эпителиальных клеток, но и в индукции и развитии многих онкологических заболеваний (рак молочной железы, желудка, предстательной железы и др.). Одним из путей ухода опухолевых клеток из-под контроля клеточных систем регуляции пролиферативных процессов может служить гиперэкспрессия ЭФР и его рецептора не только раковыми клетками, но и клетками стромы опухоли, обеспечивающая возможность осуществления ауто- или паракринной активации пролиферации опухолевых клеток. В связи с этим вмешательство в процессы связывания ЭФР с рецептором и внутриклеточной каскадной передачи пролиферативного сигнала может оказаться перспективным подходом к терапии широкого спектра онкологических заболеваний.

Таблица 13. Клиническое значение рецептора ЭФР 1 типа (ErbB1)

Опухоль	Уровень ErbB1	Прогноз
Карцинома желудка, гортани, тимомы	Гиперэкспрессия ErbB1 Ген erbB1 амплифицирован	Высокая степень инвазивности и биологической агрессивности опухоли (неблагоприятный прогноз)
Карцинома желудка (поздние стадии)	Экспрессия ErbB1	Быстрая прогрессия опухоли, метастазы в лимфатических узлах
Рак легкого, пищевода, злокачественные глиомы	Гиперэкспрессия ErbB1 Ген erbB1 амплифицирован	Быстрая прогрессия опухоли (неблагоприятный прогноз)
Карцинома головы и шеи	Гиперэкспрессия ErbB1, но при этом ген erbB1 амплифицирован лишь у 5–20% пациентов	Неблагоприятный прогноз
Рак желудка	Высокий уровень экспрессии ErbB1 у 15% пациентов	Высокая степень инвазии в стенку желудка, метастазирование в лимфатические узлы
Опухоль яичников	Экспрессия мРНК, кодирующей ErbB1	Выживаемость пациентов с мРНК ErbB1 (+) значительно ниже, чем пациентов с мРНК ErbB1 (–)
Глиома	Гиперэкспрессия ErbB1 при отсутствии амплификации гена erbB1	Метастазирование и быстрая прогрессия опухолей
Карцинома мочевого пузыря, мультиформная глиобластома	Гиперсекреция ErbB1 Ген erbB1 амплифицирован	Высокая инвазивность и быстрая прогрессия опухоли

Существует несколько вариантов воздействия на рецептор ЭФР и регулируемые им клеточные процессы:

1. Использование блокаторов взаимодействия ЭФР с рецептором;
2. Применение препаратов, влияющих на функциональную активность рецептора ЭФР, в первую очередь ингибиторов его тирозинкиназной активности;

3. Подавление экспрессии ЭФР и его рецептора с помощью противоопухолевых химиопрепаратов, антисмысловых олигонуклеотидных последовательностей и рибозимов;
4. Использование рекомбинантных гибридных белков (включающих комбинации аминокислотных последовательностей ЭФР и природных токсинов) и химических конъюгатов ЭФР с цитотоксическими агентами. В данном случае препарат направленного действия за счет векторного компонента связывается с рецептором ЭФР поверхности опухолевых клеток и переносится в цитозоль в ходе рецепторопосредованного эндоцитоза.

Таблица 14. Противоопухолевые препараты, воздействующие на сигнальную систему ЭФР–рецептор ЭФР

Препарат	Описание	Статус	Ссылка
ПРЕПАРАТЫ, ПОДАВЛЯЮЩИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭФР С РЕЦЕПТОРОМ			
Специфическое подавление			
Cetuximab (Erbix®)	Химерные (человек-мышь) антитела к рецептору ЭФР	Препарат	[222]
Trastuzumab (Herceptin®)	Гуманизированные антитела к рецептору ЭФР (HER2)	Препарат	[2]
Pertuzumab (Omnitarg®)	Гуманизированные антитела к рецептору ЭФР (HER2)	Клинические испытания III фаза	[302]
Panitumumab (Vectibix®)	Человеческие антитела к рецептору ЭФР (HER2)	Клинические испытания I-II фаза	[267]
Nimotuzumab (h-R3)	Гуманизированные антитела к рецептору ЭФР	Клинические испытания I-II фаза	[267]
Matuzumab (EMD-72000)	Гуманизированные антитела к рецептору ЭФР	Клинические испытания I-II фаза	[267]
Неспецифическое подавление			
Сурамин	Полисульфонат мочевины (полианион)	Клинические испытания III фаза	[348]

ЭФР и его рецептор играют важную роль в регуляции процессов выживания, пролиферации и апоптотической гибели клеток. Для опухолевых клеток, отличающихся особенно высоким уровнем экспрессии рецептора ЭФР, одним из наиболее значимых факторов, обеспечивающих выживание, является постоянное присутствие во внеклеточной среде ЭФР, обладающего способностью к стимуляции пролиферации клеток и блокированию апоптоза [171]. Подтверждением этому служит факт индукции апоптоза в опухолевых клетках при блокировании центра связывания рецептора с ЭФР. Поскольку ЭФР индуцирует экспрессию циклина D1, являющегося одним из ключевых медиаторов прохождения клеточного цикла, блокирование рецептора ЭФР, локализованного на поверхности опухолевых клеток (например, при раке прямой кишки и простаты), вызывает подавление

экспрессии D1 и остановку клеточного цикла в фазе G₁ с последующей индукцией апоптоза [245].

Таблица 14 (продолжение). Противоопухолевые препараты, воздействующие на сигнальную систему ЭФР–рецептор ЭФР

Препарат	Описание	Статус	Ссылка
ВЛИЯНИЕ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ РЕЦЕПТОРА ЭФР (ИНГИБИТОРЫ РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ)			
Erlotinib (OSI-774, Tarceva®)	Синтетический низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы – производное хиназолина	Препарат	[255]
Gefitinib (ZD1839, Iressa®)	Синтетический низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы – производное хиназолина	Препарат	[372]
Lapatinib (GW572017, Tyverb®, Tykerb®)	Синтетический низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы – производное хиназолина	Препарат	[372]
Canertinib (CI1033)	Производное хиназолина; необратимо ингибирует активность рецептора, ковалентно связываясь с остатком цистеина в АТФ-связывающем центре рецептора	Клинические испытания III фаза	[269]
Генистеин	5,7,4'-тригидроксиизофлавоон из <i>Pseudomonas</i> spp., ингибитор тирозинкиназы	Клинические испытания II фаза	[241]
Vandetanib (ZD6474, Zactima®)	Синтетический низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы	Клинические испытания II фаза	[391]
EKB569	3-цианохинолин; необратимо ингибирует активность рецептора, ковалентно связываясь с остатком цистеина в АТФ-связывающем центре рецептора	Клинические испытания II фаза	[269]
SU6668	Синтетический низкомолекулярный ингибитор тирозинкиназы	Клинические испытания I фаза	[65]
Тирфостины	Низкомолекулярные синтетические ингибиторы тирозинкиназы	Доклинические испытания	[232]
ПРЕПАРАТЫ, ОКАЗЫВАЮЩИЕ ВЛИЯНИЕ НА СИНТЕЗ И СЕКРЕЦИЮ ЭФР			
Тамоксифен	Антиэстроген нестероидной природы	Препарат	[30]
Сандостатин (Октреотид)	Октапептид – синтетический аналог соматостатина	Препарат	[385]
Антисмысловые РНК	Последовательности РНК, комплементарные участкам последовательностей мРНК, кодирующих ЭФР или его рецептор	Доклинические испытания	[39, 277]

Препараты, блокирующие взаимодействие ЭФР с рецептором

Ряд разработанных средствами нанобиотехнологии препаратов, действие которых направлено на регуляцию ЭФР-зависимых процессов (табл. 14), уже допущено к терапевтическому применению или находится на стадии клинических исследований. Прежде всего следует отметить препараты антител, вызывающие специфическое блокирование взаимодействия ЭФР с рецептором (рис. 102, табл. 14). Препараты химерных («Cetuximab») и гуманизированных («Trastuzumab») антител уже применяются в противоопухолевой

терапии [2, 222, 279]. Неспецифическое блокирование взаимодействия ЭФР с рецептором вызывает препарат сурамин (рис. 102, табл. 14), который представляет собой полисульфонат нафтилмочевины. Будучи крупным полианионом, сурамин практически не проникает в клетки. В медицине сурамин традиционно применяется в качестве антипротозойного и

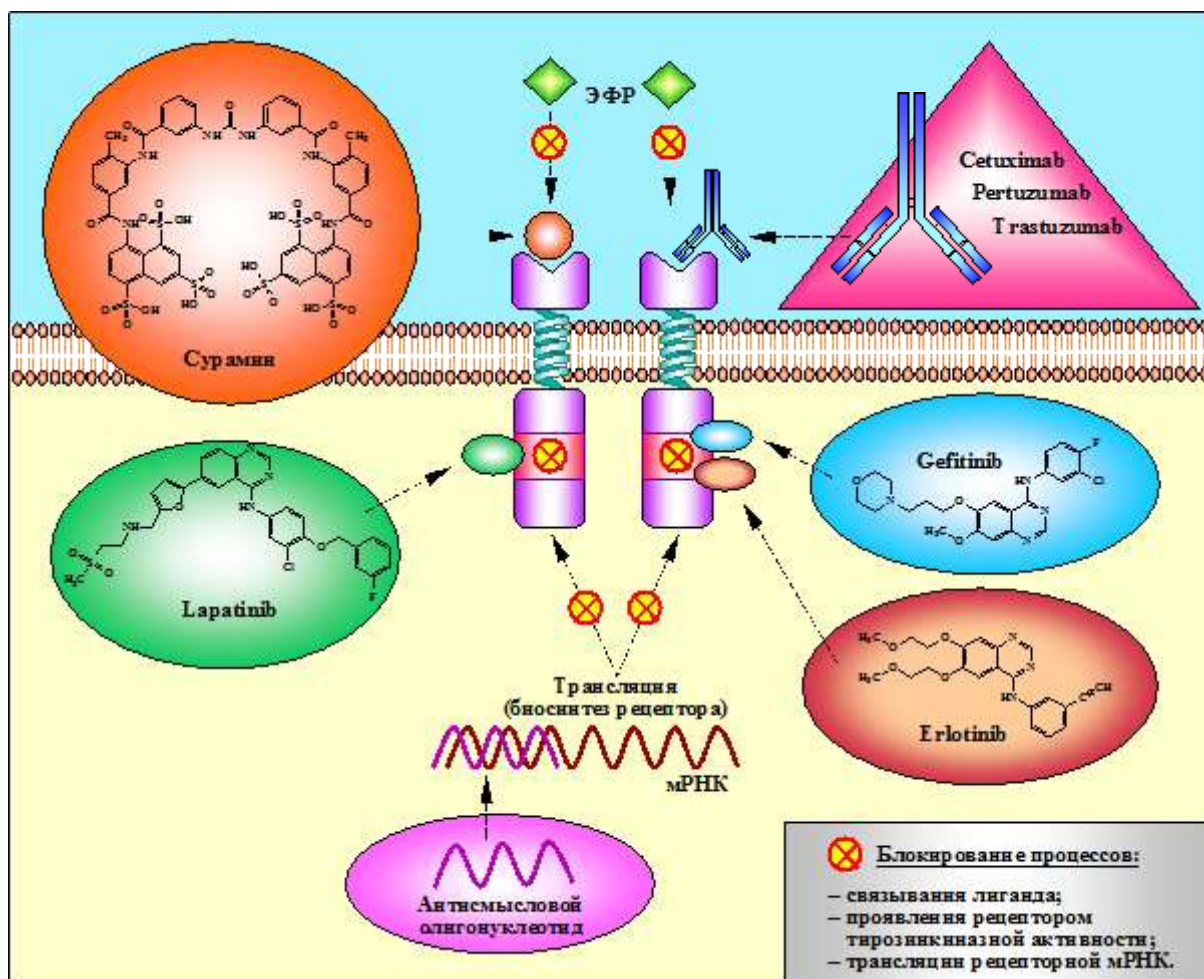


Рис. 102. Некоторые противоопухолевые препараты, воздействующие на сигнальную систему ЭФР–рецептор ЭФР. Являясь полианионом, сурамин неспецифически связывается с рецептором ЭФР и препятствует его активации лигандом. В отличие от сурамина, моноклональные антитела Cetuximab, Pertuzumab и Trastuzumab являются высокоспецифичными блокаторами взаимодействия ЭФР с рецептором. Нарушение активации рецептора лигандом приводит к угнетению опухолевого роста и апоптотической гибели опухолевых клеток. Подавление опухолевого роста также достигается при применении препаратов, ингибирующих тирозинкиназную активность рецептора ЭФР. К подобным препаратам относятся производные хиназолина Lapatinib, Gefitinib и Erlotinib, которые путем взаимодействия с АТФ-связывающим центром блокируют автофосфорилирование и активацию рецептора. Противоопухолевое действие также оказывают олигонуклеотидные антисмысловые последовательности. Синтетические последовательности РНК, комплементарные участкам последовательностей мРНК, кодирующих ЭФР или рецептор ЭФР, попадая в опухолевые клетки, связываются с соответствующими мРНК и препятствуют трансляции и последующей секреции ЭФР или рецептора ЭФР.

антигельминтного средства, однако в последние годы была также отмечена противоопухолевая активность препарата, который особенно эффективен в отношении гормонорезистентного рака предстательной железы [229, 348]. Механизм действия сурамина основан на конкурентном ингибировании взаимодействия различных лигандов с рецепторами. Нарушение взаимодействия ЭФР с рецепторами, локализованными на поверхности опухолевых клеток, приводит к блокированию сигналов выживания и пролиферации опухолевых клеток и вызывает их апоптотическую гибель.

Препараты – ингибиторы тирозинкиназной активности рецептора ЭФР

Важной группой препаратов, влияющих на функциональную активность рецептора ЭФР, являются синтетические ингибиторы его тирозинкиназной активности (рис. 102, табл. 14). Ряд препаратов этой группы проходит клинические испытания, а производные хиназолина «Erlotinib» (коммерческое название Tarceva®), «Gefitinib» (коммерческое название Iressa®) и «Lapatinib» (коммерческие названия Tyverb®, Tykerb®) применяются в клинике для лечения онкологических заболеваний [269].

Препараты, подавляющие синтез и секрецию ЭФР и его рецептора

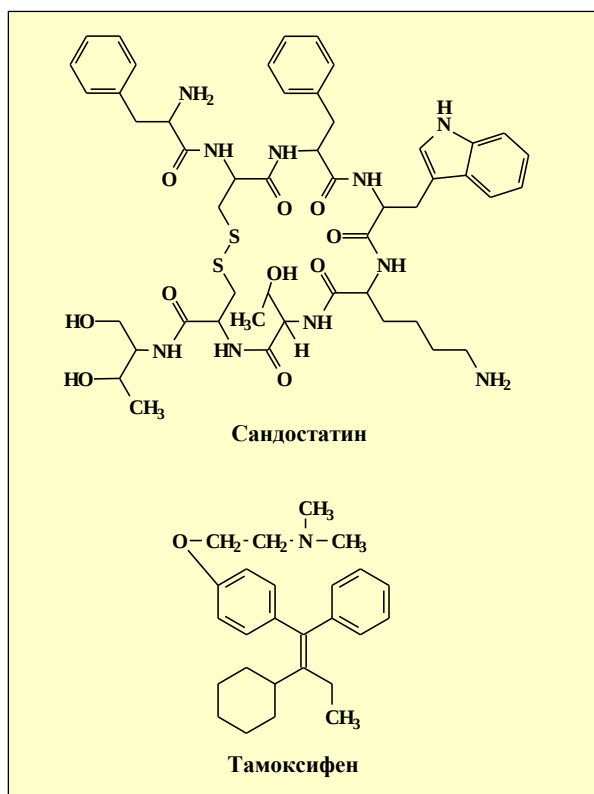


Рис. 103. Химические структуры препаратов сандостатина и тамоксифена, подавляющих синтез и секрецию ЭФР опухолевыми клетками.

Помимо блокирования лиганд-рецепторных взаимодействия и влияния на функциональную активность рецептора, подавление злокачественного роста может быть достигнуто благодаря влиянию на синтез и секрецию ЭФР опухолевыми клетками и клетками стромы опухоли (табл. 14). Препараты «Сандостатин» (синтетический аналог соматостатина) и «Тамоксифен» (антиэстроген нестероидной природы) (рис. 103) подавляют синтез и секрецию ЭФР, препятствуя таким образом активной пролиферации опухолевых клеток.

Еще один подход к подавлению опухолевого роста заключается в применении синтетических антисмысловых олигонуклеотидных последовательностей, доставляемых в опухолевые клетки с помощью векторных молекул или «нацеленных» липосом. Антисмысловые последовательности, комплементарные мРНК,

кодирующим ЭФР или рецептор ЭФР, попадая в опухолевые клетки, связываются с соответствующими мРНК и препятствуют трансляции этих белков (рис. 102, табл. 14). Хотя блокирование процессов трансляции и секреции приводит к подавлению опухолевого роста, до настоящего времени антисмысловые последовательности не нашли медицинского применения в связи с трудностями, возникающими при обеспечении их стабильности и эффективной доставки непосредственно к месту локализации мишеней. Кроме того, являясь

Таблица 14 (продолжение). Противоопухолевые препараты, воздействующие на сигнальную систему ЭФР–рецептор ЭФР

Препарат	Описание	Статус	Ссылка
ПРЕПАРАТЫ, ДОСТАВЛЯЮЩИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ АГЕНТ В КЛЕТКИ-МИШЕНИ			
DAB ₃₈₉ EGF	Рекомбинантный гибридный белок (ЭФР–фрагмент дифтерийного токсина DAB ₃₈₉)	Клинические испытания	[94]
ЭФР–хлорин е6	Конъюгат, в котором ЭФР связан с хлорином е6 через декстран	Доклинические испытания	[106]
ЭФР–ЧСА–хлорин е6	Конъюгат, компоненты которого связаны с полимерным глутаровым альдегидом	Доклинические испытания	[106]
ЭФР–декстран– ⁹⁹ Tc	Конъюгат ЭФР с радиоактивно меченым декстраном	Доклинические испытания	[32]
¹²⁵ I–ЭФР–декстран	Конъюгат ¹²⁵ I–меченного ЭФР с декстраном	Доклинические испытания	[32]
⁶⁸ Ga-DOTA-hEGF	ЭФР, модифицированный реагентом DOTA с включенным галлием ⁶⁸ Ga	Доклинические испытания	[357]
erb38	Рекомбинантный гибридный белок, включающий dsFv-фрагмент антител к рецептору ЭФР (ErbB2) и фрагмент псевдомонадного экзотоксина PE38	Клинические испытания	[236]
Ковалентные конъюгаты ЭФР с цитотоксическими агентами	Цитотоксические агенты: - Фталоцианины (алюминия, кобальта) - Окта-4,5-карбоксифталоцианин (терафтал) - Винкристин, винбластин - Доксорубин, карминомицин - Эсперамицин, калихемицин - Генистеин	Доклинические испытания	[190-192, 286, 349, 401, 407]
Ковалентный конъюгат рецептор-связывающего фрагмента ЭФР с доксорубином	Рецепторсвязывающий фрагмент ЭФР представляет собой синтетический пептид, состоящий из 11 аминокислотных остатков	Доклинические испытания	[190]
«Нацеленные» мицеллы, несущие водорастворимый борат акридина (WSA(¹⁰B))	Мицеллы из фосфатидилэтаноламина, конъюгированного с ПЭГ 2000, к которому ковалентно присоединен ЭФР Для разрушения опухолевых клеток используется метод нейтронно-захватной терапии*	Доклинические испытания	[21]
«Нацеленные» липосомы, несущие WSA(¹⁰B)	Липосомы из фосфатидилхолина, покрытые ПЭГ с ковалентно присоединенным ЭФР	Доклинические испытания	[21]
* После накопления в опухоли достаточного количества препарата «нацеленных» мицелл, несущих водорастворимый борат акридина (WSA(¹⁰ B)), производят ее облучение потоком тепловых нейтронов. При этом стабильный изотоп ¹⁰ B эффективно поглощает нейтрон с образованием возбужденного ядра ¹¹ B, которое быстро распадается на ядро лития и α-частицу, оказывающее разрушительное действие на опухолевые клетки. Метод нейтрон-захватной терапии (Boron Neutron Capture Therapy) применяется для лечения опухолей мозга.			

полианионами, антисмысловые последовательности могут легко связываться и инактивироваться различными положительно заряженными макромолекулами и клеточными структурами.

ЭФР как векторный компонент препаратов направленного действия

Как было показано выше, в настоящее время активно разрабатываются, изучаются и уже применяются на практике препараты, действие которых направлено на блокирование или регуляцию функциональной активности рецептора ЭФР, однако особый интерес представляют нанопрепараты, осуществляющие адресную доставку терапевтических агентов в клетки-мишени (табл. 14). Уже получен ряд нанопрепаратов направленного действия с использованием ЭФР в качестве векторного компонента (рис. 104-107). Помимо полноразмерной молекулы ЭФР при создании таких препаратов может быть использован ее рецепторсвязывающий фрагмент. К преимуществам применения пептидных векторов относятся: избирательность действия; стабильность и отсутствие токсичности; высокая эффективность интернализации; возможность использования для целевой доставки в клетки-мишени широкого спектра лекарственных препаратов; доступность в препаративных количествах и относительно низкая стоимость производства.

Конъюгаты ЭФР с противоопухолевыми антибиотиками и алкалоидами

Из числа полученных в последнее время препаратов направленного действия к наиболее перспективным относятся конъюгаты ЭФР и его рецепторсвязывающего фрагмента с антибиотиком доксорубицином [190, 191] (рис. 104). Оба конъюгата обладают высокой противоопухолевой активностью, однако преимуществом пептидного фрагмента может являться более низкая иммуногенность.

Рецепторсвязывающий фрагмент, идентичный участку последовательности ЭФР человека, включающему с 21 по 31 аминокислотные остатки, получали методом твердофазного пептидного синтеза. Синтетический фрагмент способен эффективно связываться с рецептором ЭФР и выполнять функцию вектора для направленной доставки цитотоксических агентов в опухолевые клетки. При получении конъюгата в качестве гомобифункционального кросс-линкера для ковалентного присоединения доксорубидина к пептиду был использован глутаровый альдегид.

Доксорубин – антибиотик антрациклинового ряда с широким спектром противоопухолевой активности, применяющийся в клинике при терапии солидных опухолей, таких как рак молочной железы и легкого. Попадая в ядро, доксорубин интеркалирует между парами азотистых оснований ДНК и вызывает гибель клетки. Как химиопрепарат, доксорубин, несмотря на широкое клиническое применение, имеет ряд существенных недостатков, к числу которых относятся высокая кардиотоксичность и быстро развивающаяся резистентность опухолевых клеток при внутривенных введениях. Адресная доставка доксорубидина в опухолевые клетки с помощью пептидного фрагмента ЭФР может

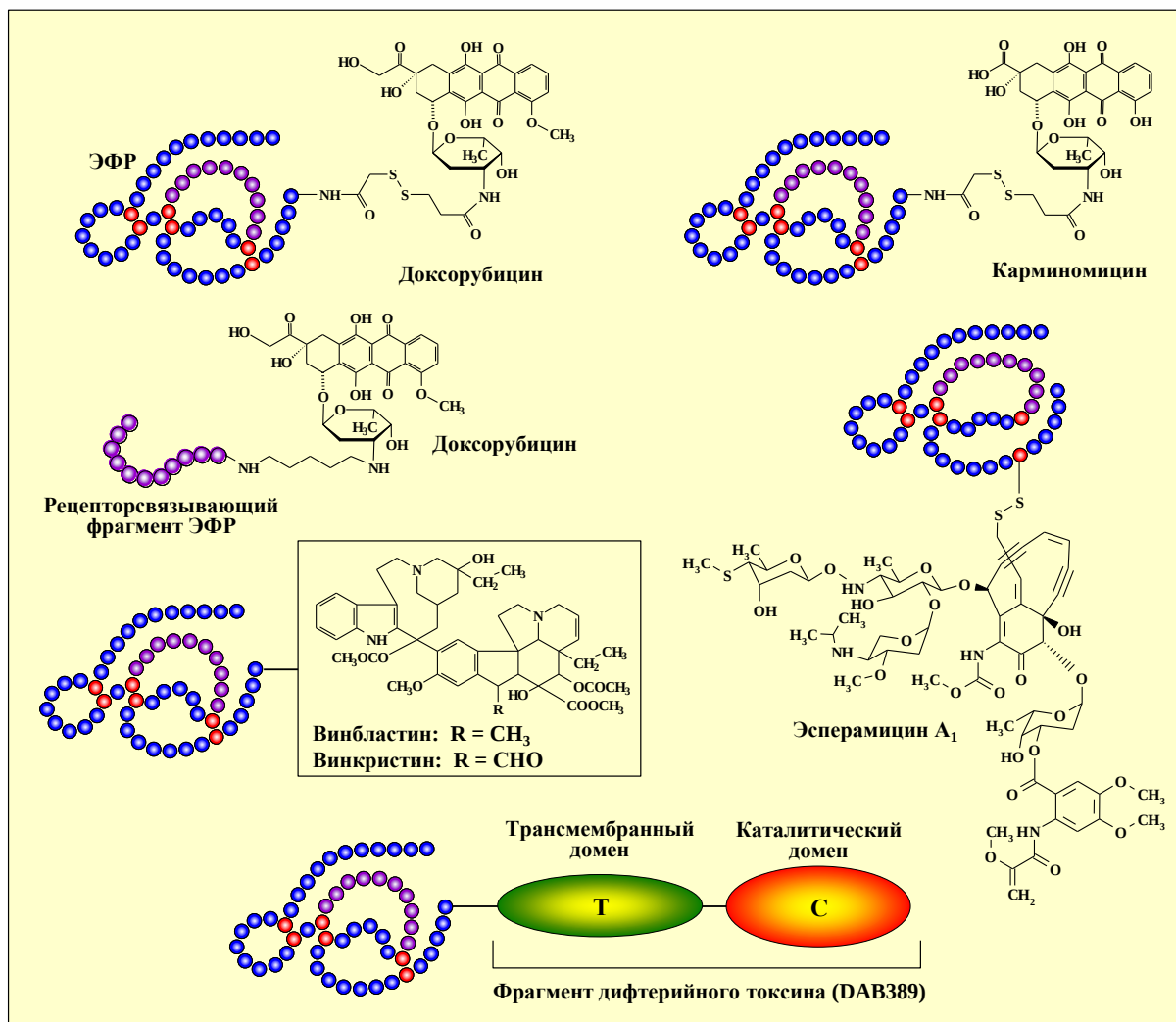


Рис. 104. Использование ЭФР в качестве векторного компонента противоопухолевых препаратов направленного действия. Конъюгаты ЭФР и его рецепторсвязывающего фрагмента с противоопухолевыми антибиотиками антрациклинового (доксорубицин, карминомицин) и эндиинового ряда (эсперамицин A₁), винкаалкалоидами (винбластин, винкристин) получают с применением методов прямого химического конъюгирования. Конъюгат ЭФР с фрагментом дифтерийного токсина получают в виде «слитого» рекомбинантного белка с помощью генно-инженерных методов.

позволить избежать указанных побочных эффектов. Экспериментальное применение конъюгата пептидного фрагмента ЭФР с доксорубицином для лечения солидных опухолей у мышей позволяло добиваться значительных терапевтических эффектов (редукции опухолей и увеличения средней продолжительности жизни) даже в дозах, гораздо более низких по сравнению с используемыми в клинике. Препарат также эффективен в подавлении роста резистентных к доксорубицину опухолей, причем его терапевтическая активность значительно превышает активность свободного доксорубицина [190].

Помимо доксорубина для получения противоопухолевых препаратов направленного действия также использовались антрациклиновый антибиотик карминомицин, антибиотик ендиинового ряда эсперамицин А₁, винкаалкалоиды винбластин и винкристин, хлорины и фталоцианины [190-192, 401, 407] (рис. 104, 106, 107, табл. 14). Антрациклиновые антибиотики доксорубин и карминомицин имеют сходное химическое строение и механизмы цитотоксического действия, вероятно поэтому конъюгаты этих антибиотиков с ЭФР в экспериментах на клеточных культурах и лабораторных животных также проявляли сходную противоопухолевую активность.

Эсперамицины продуцируются актиномицетами (лучистыми грибами) *Actinomadura verrucosospora* и обладают высокой токсичностью в отношении микроорганизмов и клеток человека, обусловленной наличием ендиинового цикла, перегруппировка которого приводит к образованию бирадикала, вызывающего разрывы цепей ДНК. Вследствие высокой токсичности эсперамицины вызывают сильно выраженные побочные эффекты, что ограничивает их медицинское применение, несмотря на значительную противоопухолевую активность. Препараты направленного действия на основе эсперамицинов могут оказаться эффективными противоопухолевыми средствами, поскольку векторный компонент, обеспечивающий их адресную доставку в опухолевые клетки, позволит минимизировать ущерб, наносимый эсперамицином нормальным клеткам организма. Действительно, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* конъюгаты ЭФР с эсперамицином проявляют высокую противоопухолевую активность, однако для полной оценки их терапевтического потенциала необходимы дополнительные исследования.

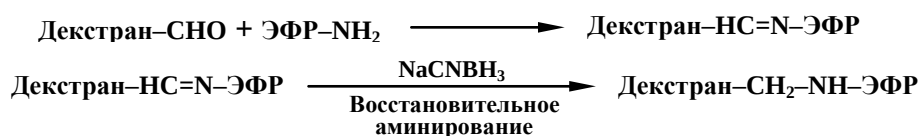
К винкаалкалоидам относятся получаемые из растения барвинок розовый (*Vinca rosea* L.) винбластин и винкристин, имеющие в своем составе две полициклические единицы – виндолин и катарантин. По действию винкаалкалоиды являются цитостатиками, обладающими противоопухолевой активностью. Цитостатический эффект проявляется при взаимодействии винкаалкалоидов с белком тубулином, которое препятствует его полимеризации (образованию микротрубочек) и формированию веретена деления. В результате винкаалкалоиды останавливают митоз на стадии метафазы и вызывают апоптотическую гибель опухолевых клеток. В настоящее время винкаалкалоиды, как и антрациклиновые антибиотики, применяются в клинике в качестве противоопухолевых химиопрепаратов. Использование винкаалкалоидов в составе конъюгатов с ЭФР может значительно повысить эффективность терапии за счет адресности их доставки, о чем свидетельствуют данные, полученные при исследовании противоопухолевой активности конъюгатов ЭФР с винбластином и винкристином. Хотя конъюгаты ЭФР с винкаалкалоидами проявляли значительную противоопухолевую активность в экспериментах на культурах клеток и животных, как и в случае с антибиотиками ендиинового ряда необходим комплекс дальнейших исследований для определения возможностей применения этих препаратов в клинике.

Рекомбинантные химерные токсины

Еще одним интересным направлением нанобиотехнологии является получение препаратов направленного действия средствами генной инженерии в виде гибридных («слитых») рекомбинантных белков, включающих последовательности векторного и токсического компонентов. Полученный таким образом рекомбинантный химерный белок DAB₃₈₉EGF (рис. 104), представляющий собой продукт экспрессии гибридного гена, в котором связывающий домен дифтерийного токсина замещен на человеческий ЭФР, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* проявлял высокую противоопухолевую активность [188, 231]. Препарат DAB₃₈₉EGF подавляет развитие рака мочевого пузыря, молочной железы и яичников и в настоящее время проходит клинические испытания. Также клинические испытания проходит препарат erb38 – рекомбинантный гибридный белок, включающий фрагмент антитела к рецептору ЭФР 2 типа (ErbB2), «слитый» с фрагментом псевдомонадного экзотоксина (PE38) (табл. 14). Помимо конъюгатов ЭФР с микробными токсинами, получены и активно исследуются его конъюгаты с субъединицей А растительного токсина рицина. В экспериментах на культурах опухолевых клеток продемонстрирована высокая противоопухолевая активность таких конъюгатов.

Конъюгаты ЭФР с носителями радионуклидов

Векторный потенциал ЭФР может быть также использован для доставки радионуклидов в опухолевые клетки (рис. 105, табл. 14). Примером таких препаратов может служить конъюгат меченного радиоактивным изотопом иода ¹²⁵₅₃I мышинового ЭФР с декстраном. Радионуклид был введен в остатки тирозина и гистидина молекулы ЭФР с помощью реагента хлорамина Т. Конъюгат ЭФР с декстраном может быть получен путем прямого связывания аминок групп белка с альдегидными группами декстрана [390]:



К декстрану, входящему в состав конъюгата, могут быть дополнительно химически присоединены различные противоопухолевые агенты.

Также получены конъюгаты ЭФР с декстраном, несущие радиоизотопы технеция ⁹⁹₄₃Tc и иода ¹²⁵₅₃I. В данном случае в качестве носителя радионуклидов выступает не ЭФР, а декстран. В клинических испытаниях при лечении рака мочевого пузыря конъюгаты проявляли высокую противоопухолевую активность [32]. Помимо декстранов в качестве носителей радионуклидов могут применяться специальные хелатирующие агенты. Так, получен конъюгат человеческого ЭФР с хелатирующим агентом DOTA, способный доставлять в клетки изотоп галлия ⁶⁸₃₁Ga (68Ga-DOTA-hEGF) [357]. Этот конъюгат может

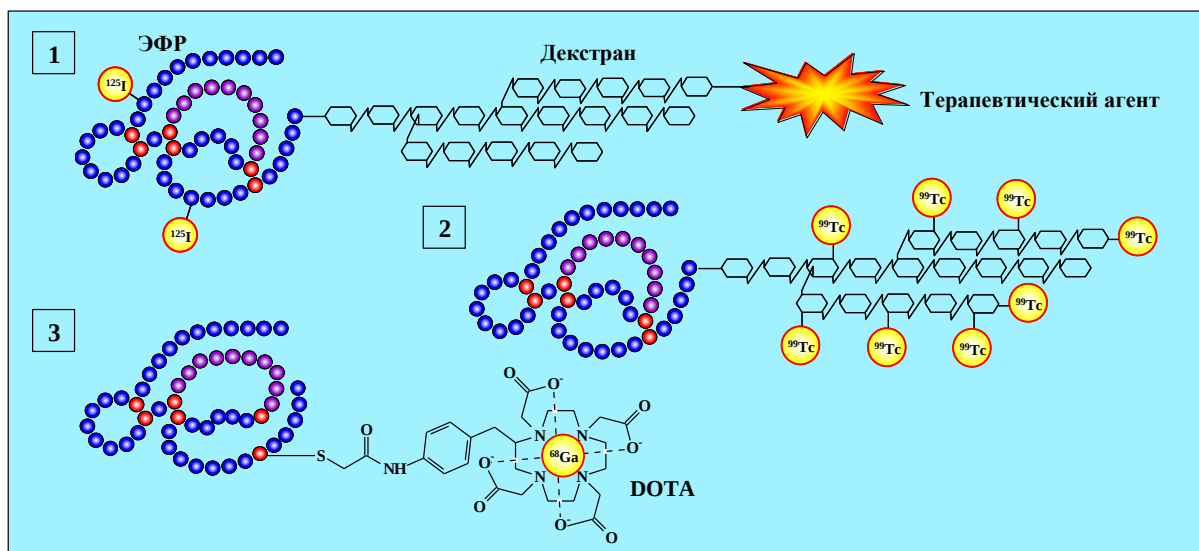


Рис. 105. Радиоактивные противоопухолевые препараты направленного действия, в которых в качестве векторной молекулы используется ЭФР. 1. Конъюгат ^{125}I -меченного ЭФР с декстраном. К декстрану могут быть присоединены различные терапевтические агенты. 2. Конъюгат ЭФР с декстраном, несущим радиоактивный изотоп технеция ^{99}Tc . 3. ЭФР, модифицированный реагентом DOTA с включенным радиоактивным изотопом галлия ^{68}Ga .

быть использован для диагностики онкологических заболеваний и определения места локализации опухолей и метастазов в организме человека.

Конъюгаты ЭФР с фотоцитотоксическими соединениями

Синтезированы конъюгаты ЭФР с декстраном, используемым в качестве носителя обладающих фотоцитотоксическими свойствами хлорина e_6 и его производного ($\text{Sn(IV)Ce}_6(\text{ED})$) [106] (рис. 106). В конъюгате ЭФР с альбумином, полученном теми же авторами, в качестве носителя производного $\text{Sn(IV)Ce}_6(\text{ED})$ используется альбумин (рис. 106, табл. 14). Все представленные выше конъюгаты проявляли значительную фотоцитотоксическую активность в отношении культуры клеток аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-468. Механизм противоопухолевого действия конъюгатов ЭФР с фотоактивными цитотоксическими соединениями заключается в следующем: после связывания векторного компонента с рецептором конъюгаты переносятся в опухолевые клетки в ходе рецепторопосредованного эндоцитоза. После накопления в клетках достаточного количества препарата проводят облучение опухоли светом определенной длины волны, которое индуцирует образование активных форм кислорода, вызывающих повреждение и гибель опухолевых клеток. Такой подход к терапии, предполагающий применение фотоцитотоксических веществ, получил название фотодинамической терапии (ФДТ) [211].

В основе ФДТ лежит повреждение молекулярных структур клетки различными фотосенсибилизаторами при их облучении светом. При инкубации с клетками

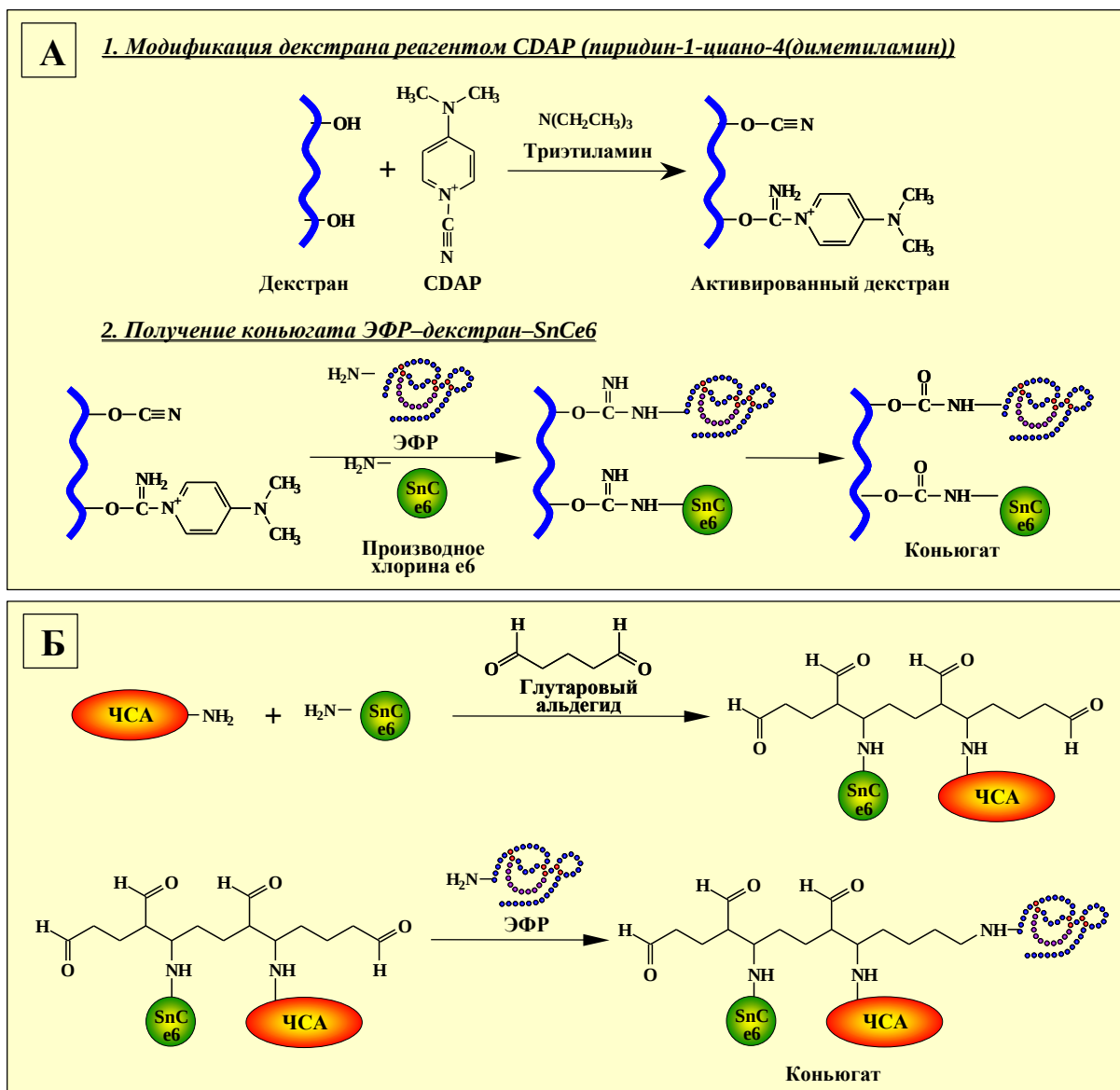


Рис. 106. Схемы реакций получения конъюгатов ЭФР с производным хлорина e6 (ЭФР–декстран–SnCe6 и ЭФР–ЧСА–SnCe6) [106]. А. При активации декстрана реагентом CDAP образуются цианатные эфиры и производные пиридинизомочевины, которые затем взаимодействуют с первичными аминогруппами ЭФР и SnCe6 с образованием стабильного конъюгата. Б. Конъюгирование ЧСА (человеческого сывороточного альбумина), SnCe6 и ЭФР осуществляли с помощью гомобифункционального кросс-линкера глутарового альдегида. В нейтральной или слабощелочной среде глутаровый альдегид образует ненасыщенные альдегидные полимеры, которые могут взаимодействовать с аминами. На первом этапе осуществляли конъюгирование ЧСА с производным хлорина SnCe6 с последующим присоединением к полученной конструкции ЭФР.

фотосенсибилизаторы преимущественно связываются с мембранами (плазматическими, митохондриальными, ядерными и мембранами шероховатого эндоплазматического ретикулума), причем основными мишенями фотодеструкции являются белки и липиды [230]. В настоящее время широко исследуется противоопухолевое фотодинамическое действие

хлоринов, фталоцианинов, порфиринов, пурпуринов и бактериохлоринов. Из перечисленных соединений фталоцианины являются наиболее изученными с точки зрения проявления противоопухолевой активности и применения в области терапии злокачественных новообразований. Фталоцианины привлекательны для противоопухолевой терапии, поскольку они способны избирательно накапливаться в опухолевых тканях, устойчивы к фотохимическому и химическому разрушению и характеризуются относительно низкой токсичностью. Применение фталоцианинов позволяет избежать нежелательных побочных эффектов, связанных с традиционной химио- и радиотерапией (нейтропения, атрофия

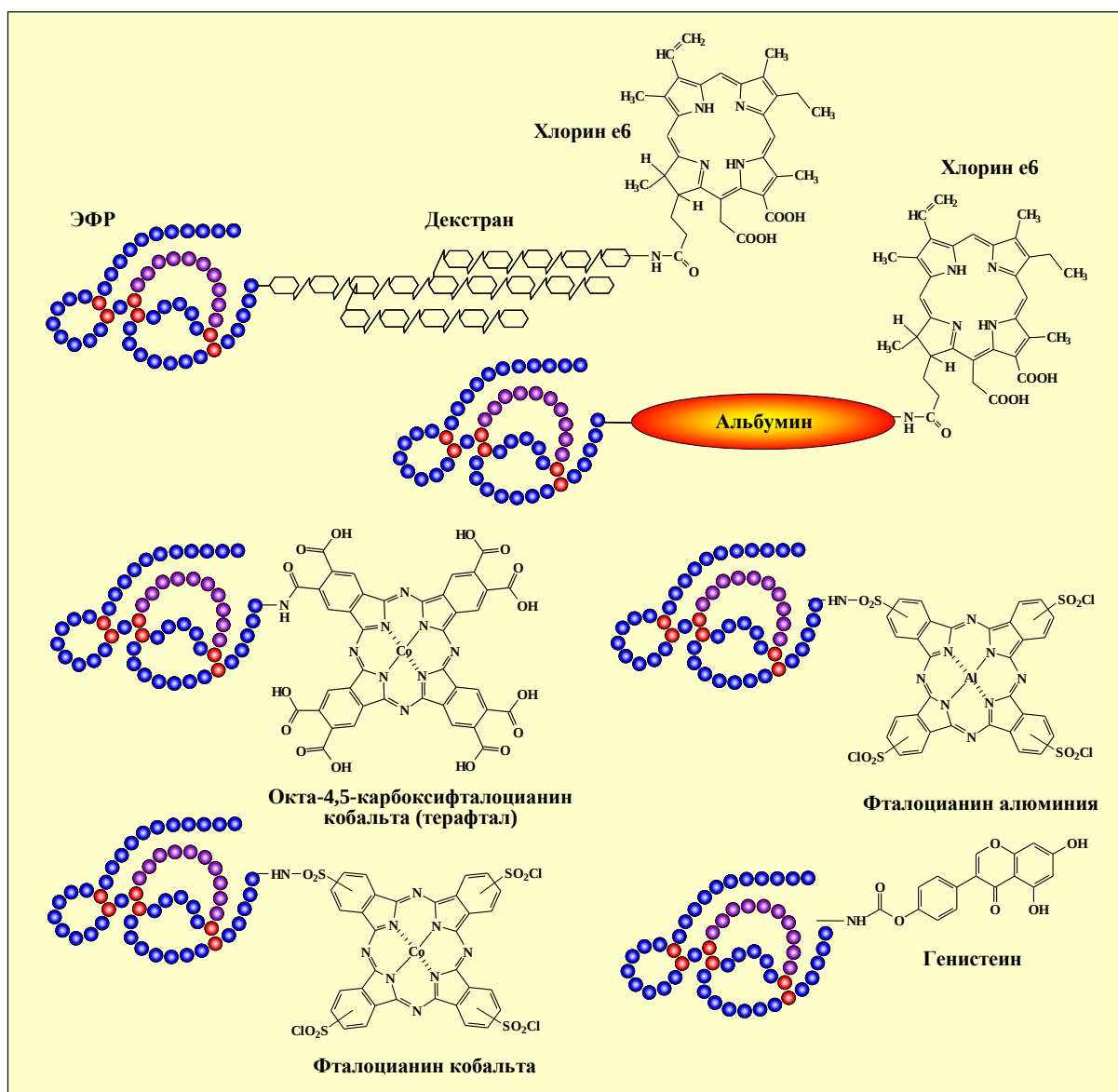


Рис. 107. Использование ЭФР в качестве векторного компонента противоопухолевых фотоактивных препаратов направленного действия. ЭФР также используют для избирательной доставки в опухолевые клетки генистеина – ингибитора тирозиновых протеинкиназ из бактерий рода *Pseudomonas*.

тканей, выпадение волос и др.), а также эффективно воздействовать на опухоли, проявляющие множественную лекарственную устойчивость [268]. К существенным недостаткам фталоцианинов как терапевтических средств следует отнести приобретение фоточувствительности нормальными тканями, особенно кожей, а также невозможность применения фотосенсибилизаторов при локализации опухолей в участках, недоступных для подведения источника света.

Использование темновой (каталитической) терапии позволяет расширить возможности использования фталоцианинов в онкологии. Так, при воздействии на опухолевые клетки фталоцианина кобальта для активации вещества достаточно ввести в клеточную среду нетоксичный для организма восстановитель, например аскорбиновую кислоту. При этом происходит генерирование активных форм кислорода, приводящее к деструкции клеточных структур и гибели клеток. Избирательность действия фталоцианинов в отношении опухолей может быть значительно повышена при использовании белковых векторных молекул, позволяющих доставлять цитотоксическое вещество непосредственно в опухолевые клетки-мишени. В настоящее время синтезирован конъюгат окта-4,5-карбоксифталоцианина кобальта (терафтала) с ЭФР, проявляющий высокую противоопухолевую активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (рис. 107, табл. 14). Получены также конъюгаты ЭФР с фталоцианинами кобальта и алюминия (рис. 107, табл. 14) [192, 401]. Конъюгат ЭФР с фталоцианином кобальта (как и конъюгат с терафталом) может применяться для проведения темновой (каталитической) терапии, а конъюгат с фталоцианином алюминия – для фотодинамической терапии опухолей поверхностной локализации. В экспериментах *in vitro* оба конъюгата проявляли значительно более высокую цитотоксическую активность по сравнению со свободными фталоцианинами в отношении культур клеток карциномы молочной железы линии MCF-7 и эпидермоидной карциномы человека линии A431.

Конъюгат ЭФР с генистеином

ЭФР был также использован как вектор в препарате направленного действия, содержащем в качестве противоопухолевого агента генистеин – ингибитор тирозинкиназ из бактерий рода *Pseudomonas* (рис. 107, табл. 14) [350]. Генистеин представляет собой 5,7,4'-тригидроксиизофлавоон, который путем ингибирования тирозинкиназной активности рецептора ЭФР вызывает подавление прогрессии опухолей молочной железы.

ЭФР как векторный компонент наночастиц

Векторный потенциал ЭФР не ограничивается доставкой в опухолевые клетки химиопрепаратов, токсинов, фталоцианинов, ингибиторов тирозинкиназ и других противоопухолевых агентов. Очевидно, что ЭФР может быть также успешно использован в

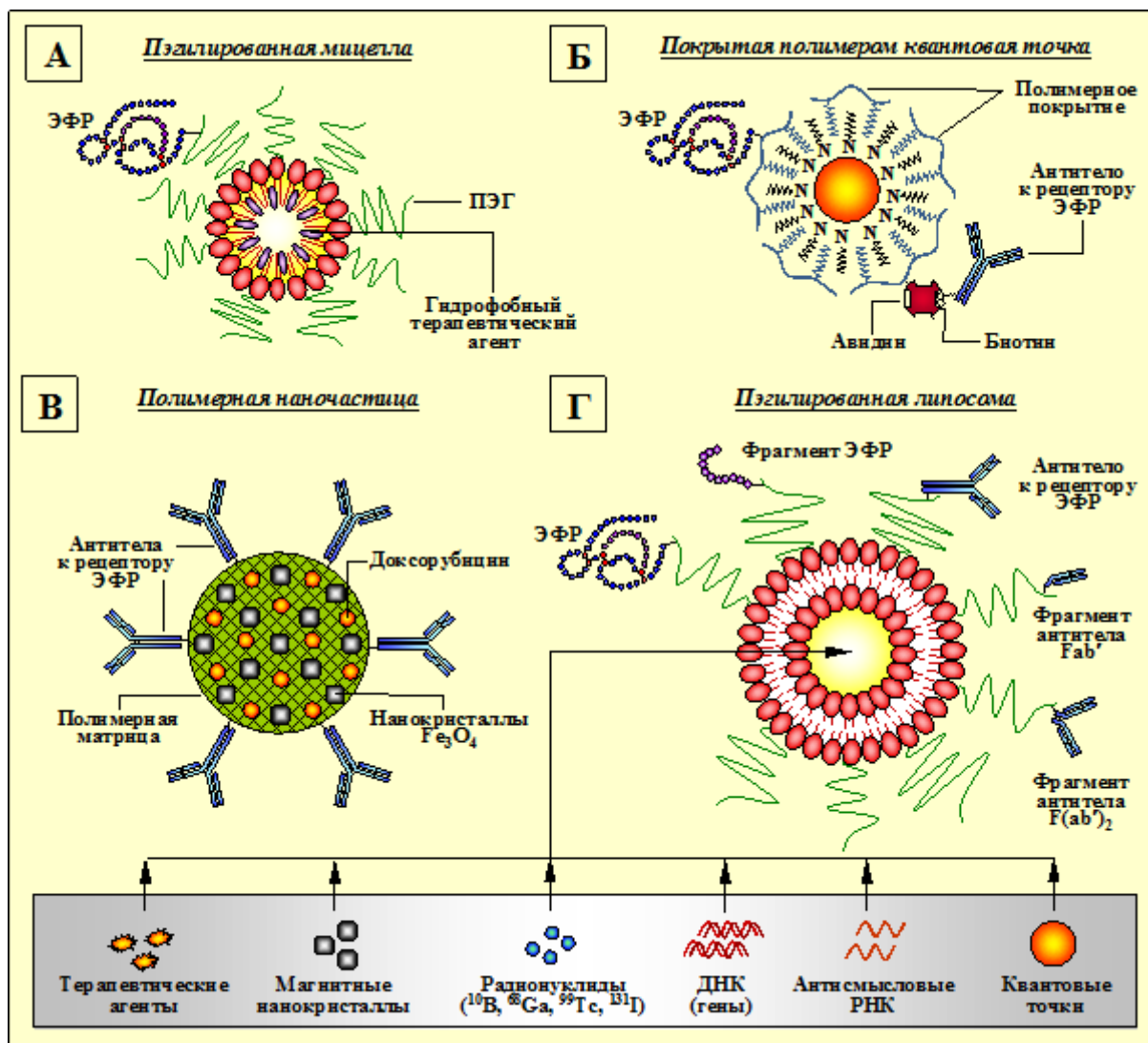


Рис. 108. Использование ЭФР, его рецепторсвязывающих фрагментов и антител к рецептору ЭФР в качестве векторных компонентов «нацеленных» фосфолипидных мицелл, квантовых точек, полимерных наночастиц и липосом, несущих терапевтические агенты и средства диагностики. А. Пэгилированные мицеллы устойчивы к поглощению макрофагами и способны избирательно доставлять в клетки-мишени гидрофобные терапевтические агенты. Б. Квантовые точки с полимерным покрытием, увеличивающим их гидрофильность и снижающим токсичность. К полимеру химически присоединяют ЭФР или антитела к его рецептору. Квантовые точки могут быть использованы для диагностики онкологических заболеваний. В. Полимерные, «нацеленные» на рецептор ЭФР наночастицы, несущие магнитные нанокристаллы и доксорубин, могут применяться как для диагностики, так и для терапии онкологических заболеваний. Г. Пэгилированные липосомы могут нести широкий спектр диагностических (магнитные нанокристаллы, квантовые точки, радионуклиды и т.д.) и терапевтических средств. В качестве векторных молекул, ковалентно связанных с цепями ПЭГ, могут использоваться ЭФР, его рецепторсвязывающие фрагменты, антитела к рецептору ЭФР, а также их Fab-фрагменты.

качестве векторного компонента различных наночастиц. Уже получены пегилированные фосфолипидные мицеллы, которые могут нести гидрофобные терапевтические агенты и

доставляться в клетки-мишени с помощью ЭФР (рис. 108 А). Также получены пегилированные «нацеленные» липосомы, в которых в качестве векторного белка выступает ЭФР [21]. Такие липосомные препараты могут доставлять в клетки-мишени антисмысловые олигонуклеотиды, фрагменты ДНК, радиоактивные изотопы и широкий спектр терапевтических агентов (рис. 108 Г). Помимо ЭФР в качестве векторного компонента «нацеленных» липосом может быть использован его рецепторсвязывающий пептидный фрагмент. На основе магнитных нанокристаллов Fe_3O_4 , внедренных в полимерную матрицу, получены наночастицы, в которых в качестве векторного компонента используются антитела против рецептора ЭФР (рис. 108 В). Связываясь за счет векторного компонента с рецепторами ЭФР, представленными на поверхности опухолевых клеток, наночастицы попадают внутрь клетки путем рецепторопосредованного эндоцитоза. После накопления в опухолевой ткани наночастицы могут быть визуализированы с помощью магнитно-резонансной томографии. В результате можно точно определять места локализации опухолей и, таким образом, проводить диагностику онкологических заболеваний. Эти же наночастицы могут быть использованы в качестве носителей химиопрепаратов, например, доксорубина. Показано, что при накоплении наночастиц в клетке доксорубин постепенно высвобождается в результате деградации импрегнированного им полимера. С помощью таких наночастиц можно одновременно проводить диагностику и лечение злокачественных новообразований. Для диагностики и лечения могут также применяться магнитные наночастицы и доксорубин, инкапсулированные в пегилированные липосомы, в которых в качестве векторных компонентов используются ЭФР, его пептидный рецепторсвязывающий фрагмент или антитела против рецептора ЭФР (рис. 108 Г). Инкапсулирование в липосомы или импрегнирование магнитными наночастицами полимерной матрицы необходимо для снижения их токсичности при введении в кровоток.

Для диагностики онкологических заболеваний также разработаны наночастицы, основу которых составляют покрытые слоем полимера квантовые точки. Поверхность таких наночастиц может быть нековалентно (через систему авидин–биотин) или ковалентно модифицирована эпидермальным фактором роста или антителами против его рецептора (рис. 108 Б).

Таким образом, ЭФР может быть успешно использован в качестве векторной молекулы, осуществляющей адресную доставку в опухолевые клетки широкого спектра терапевтических агентов разнонаправленного действия. В системах диагностики онкологических заболеваний, проводимой с помощью «нацеленных» наночастиц, ЭФР также может найти широкое применение в качестве векторного компонента.

Роль ЭФР и его рецептора в опухолевом ангиогенезе

ЭФР и его рецептор играют важную роль в регуляции физиологического и патологического ангиогенеза. О решающей роли ангиогенеза в прогрессии опухоли стало известно лишь в 1971 г., когда американским ученым И. Фолкманом была

сформулирована фундаментальная концепция, согласно которой необходимым условием для развития опухоли является ангиогенез, приводящий к формированию собственной опухолевой кровеносной сети. Ангиогенез является сложным процессом, регулируемым рядом ангиогенных и антиангиогенных факторов посредством аутокринных и паракринных сигнальных механизмов. Индукция опухолевого ангиогенеза осуществляется в результате преобладания экспрессии ангиогенных факторов над антиангиогенными, возникающего в процессе микроэволюции опухолевой ткани или под действием стрессовых факторов окружающей среды (гипоксия, гипогликемия и т.д.). Ангиогенные факторы могут продуцироваться не только опухолевыми клетками, но и клетками нормальных тканей – эндотелиоцитами, фибробластами, миоцитами, перицитами, а также иммунокомпетентными клетками, инфильтрующими опухоль. Активная секреция опухолевыми клетками ангиогенных факторов приводит к дестабилизации эндотелиоцитов близлежащих сосудов и индукции ангиогенеза. В качестве ключевого фактора, индуцирующего ангиогенез посредством активации эндотелиальных клеток, выступает фактор роста сосудистого эндотелия – VEGF, однако и ряд других белков оказывает стимулирующее действие на эндотелий (ЭФР, интерлейкин-8, основной фактор роста фибробластов bFGF и др.). Ингибирование ангиогенеза в организме осуществляется рядом эндогенных белков: тромбоспондином, ангиостатином, эндостатином, тумстатином и др.

Стимуляция эндотелиальных клеток ангиогенными факторами приводит к увеличению их пролиферативной и миграционной активности и значительному повышению уровня экспрессии интегринов. Активированные эндотелиальные клетки также секретируют матриксные металлопротеиназы и урокиназу, экспрессируют рецептор урокиназы. Протеиназы вызывают частичную деградацию прилегающего к кровеносному сосуду внеклеточного матрикса, что позволяет эндотелиальным клеткам мигрировать по направлению к источнику секреции ангиогенных факторов – опухолевой ткани. В конечном итоге происходит формирование опухолевой кровеносной сети, через которую впоследствии опухолевые клетки распространяются по всему организму (метастазирование). В связи с важной ролью ангиогенеза в прогрессии опухолей направленное воздействие на этот процесс может стать действенным инструментом в терапии злокачественных новообразований. Существует несколько терапевтических стратегий, направленных на подавление опухолевого ангиогенеза путем блокирования различных стадий ангиогенного процесса. Это может быть блокирование активирующего действия ангиогенных факторов на эндотелий, ингибирование эндотелиальных интегринов, приводящее к апоптотической гибели эндотелиоцитов, ингибирование матриксных металлопротеиназ, применение антиангиогенных агентов и др. (рис. 109).

В последние годы накапливается все больше данных, свидетельствующих о важной роли ЭФР и его рецептора в опухолевом ангиогенезе. Рецептор ЭФР экспрессируется в эндотелиальных клетках и многих типах опухолей, а его лиганды – ЭФР и ТФР α – являются ангиогенными факторами [96, 292]. Показано, что уровень экспрессии рецепторов ЭФР в клетках инвазивного рака молочной железы коррелирует с плотностью опухолевой

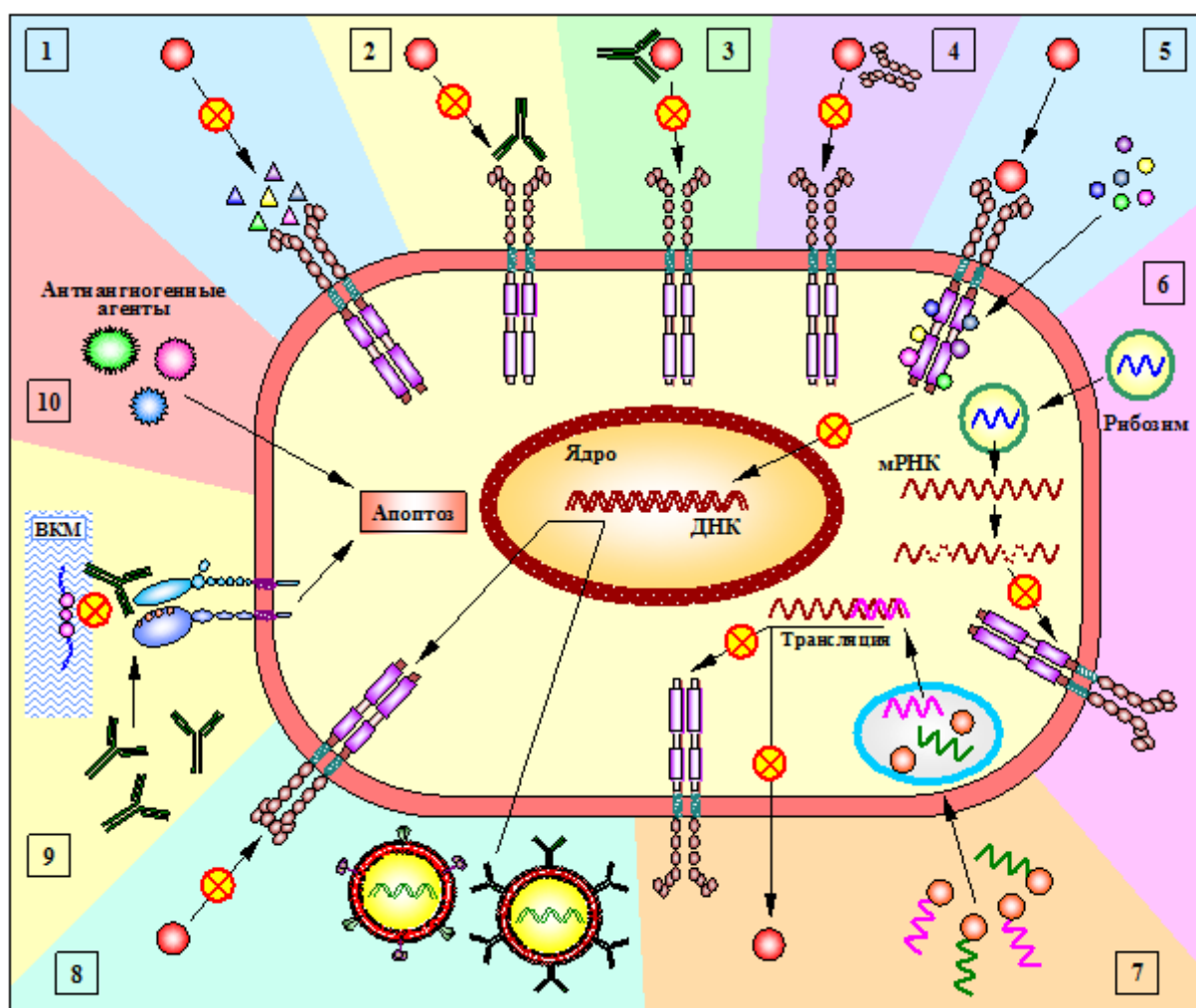


Рис. 109. Терапевтические стратегии, направленные на блокирование действия рецепторов ангиогенных факторов. Ингибирование активности рецепторов может осуществляться с помощью синтетических ингибиторов лиганд-рецепторных взаимодействий (1), антител против лиганд-связывающих участков рецепторов (2), антител против лиганда (3), растворимых форм рецептора, конкурирующих за связывание с лигандом (4), ингибиторов тирозинкиназных доменов рецептора (5). Альтернативными подходами к подавлению активности рецепторов являются: разрушение мРНК, кодирующих рецепторы, с помощью рибозимов (6), подавление трансляции рецепторов и их лигандов с помощью антисмысловых нуклеотидных последовательностей, доставляемых в клетку векторными молекулами (факторы роста, пептиды, антитела) (7), трансфекция генов, кодирующих неактивные рецепторы, с помощью вирусов и липосом (8). В клетках, проявляющих ангиогенную активность, может быть индуцирован апоптоз в результате блокирования взаимодействий интегринов с элементами ВКМ (9) или действия антиангиогенных агентов (10).

кровеносной сети [69]. На этих данных основывалось предположение, что путь передачи сигнала, реализуемый через рецептор ЭФР, индуцирует ангиогенез посредством стимуляции экспрессии VEGF или других ключевых медиаторов опухолевого ангиогенеза. Подтверждением этому предположению послужили эксперименты, демонстрирующие, что уровень экспрессии рецептора ЭФР коррелирует с уровнем экспрессии мощных

стимуляторов ангиогенеза – матриксных металлопротеиназ и VEGF, а также неблагоприятным прогнозом течения заболевания при раке головы и шеи [227]. Показано также, что активация рецептора ЭФР лигандом (ЭФР или ТФР α) вызывает повышение уровня экспрессии VEGF в клетках глиомы, рака простаты, плоскоклеточной карциномы головы и шеи [112, 226, 216]. Таким образом, весьма вероятно, что сигнальная система ЭФР может играть важную роль в прогрессии опухоли посредством индукции повышения уровня экспрессии металлопротеиназ и VEGF.

Антиангиогенные препараты, действующие на систему ЭФР–рецептор ЭФР

Свидетельства важной роли сигнальной системы ЭФР в опухолевом ангиогенезе были получены в экспериментах по блокированию рецептора ЭФР и подавлению опухолевого роста с помощью моноклональных антител и ингибиторов тирозинкиназной активности (табл. 14). В настоящее время отдельные препараты, воздействующие на рецептор ЭФР и обладающие не только противоопухолевой, но и антиангиогенной активностью, находятся на стадии клинических испытаний или уже допущены к применению. Так, препарат «Cetuximab» (коммерческое название Erbitux®), включающий химерные (человек-мышь) антитела против рецептора ЭФР, применяется для лечения немелкоклеточного рака легких, рака прямой кишки, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и других опухолей. Помимо прямого воздействия на опухолевые клетки, «Cetuximab» подавляет также и ангиогенез, способствуя блокированию прогрессии опухолей за счет воздействия на систему их кровоснабжения [10, 34, 279]. Механизм антиангиогенного действия препарата связан с подавлением экспрессии ангиогенных агентов – VEGF, интерлейкина-8 и bFGF. Очевидно, что в проявление общей противоопухолевой активности препарата «Cetuximab» существенный вклад вносит и антиангиогенная активность. Еще более высокую противоопухолевую активность «Cetuximab» проявляет при его комбинированном применении с паклитакселом (таксолом). При этом наблюдается не только подавление экспрессии ангиогенных агентов (bFGF, VEGF, интерлейкина-8, матриксной металлопротеиназы ММП 9), но и ингибирование индуцируемой опухолью неоваскуляризации [135].

Препарат «Gefitinib» (ZD 1839, коммерческое название Iressa®) является хиназолиновым ингибитором тирозинкиназной активности рецептора ЭФР. «Gefitinib» блокирует автофосфорилирование рецептора ЭФР, индуцирует остановку клеточного цикла и подавляет пролиферацию опухолевых клеток [372]. При действии препарата на опухолевые клетки, отличающиеся высоким уровнем экспрессии рецептора ЭФР и его лигандов (ЭФР и ТФР α), наблюдается снижение экспрессии ангиогенных факторов (VEGF, ТФР α и bFGF) и подавление ангиогенеза. «Gefitinib» также ингибирует ЭФР-зависимую продукцию VEGF и интерлейкина-8 в эндотелиальных клетках кровеносных капилляров, что является подтверждением наличия антиангиогенного эффекта препарата в отношении эндотелия, экспрессирующего рецептор ЭФР. Подобные эффекты характерны и для других ингибиторов

тирозинкиназной активности рецептора ЭФР (табл. 14), что указывает на очевидную связь процессов активации рецептора ЭФР и ангиогенеза. Несмотря на взаимосвязь путей каскадной передачи регуляторных сигналов, реализуемых при активации рецепторов ЭФР и VEGF, одновременное ингибирование этих рецепторов может иметь более высокий терапевтический эффект, чем инактивация каждого рецептора в отдельности. Это подтверждается модельными экспериментами на опухолях пищеварительной системы, в отношении которых была предпринята одновременная блокада рецепторов ЭФР и VEGF моноклональными антителами, входящими в состав препаратов «Cetuximab» и DC101 (мышинные антитела против рецептора VEGFR-2) [142]. При совместном применении препаратов достигался значительно более высокий терапевтический эффект, чем при индивидуальном. Очевидно, что для дальнейшей разработки эффективных терапевтических стратегий, базирующихся на подавлении активности рецептора ЭФР, необходимы дополнительные исследования, способные пролить свет на детальные механизмы участия сигнальной системы ЭФР в нормальном физиологическом и патологическом ангиогенезе.

Применение антиангиогенных агентов, вызывающих избирательную деструкцию опухолевых кровеносных сосудов, может позволить значительно увеличить арсенал действенных подходов, применяемых в онкологии. При этом антиангиогенные агенты могут явиться радикальным средством блокирования развития регионарных метастазов, часто наблюдаемого при удалении первичной опухоли. Терапевтическая эффективность препаратов направленного действия также может быть значительно увеличена при их комбинированном применении с такими антиангиогенными агентами, как белки ангиостатин и эндостатин (рис. 19, 20, 109). Антиангиогенные белки вызывают избирательную деструкцию опухолевой капиллярной сети и тем самым нарушают снабжение опухоли кислородом и питательными веществами. Дезинтеграция капиллярной сети приводит к остановке роста опухоли или ее регрессии. Являясь пептидными фрагментами белков организма (плазминогена и коллагена XVIII), ангиостатин и эндостатин стабильны и нетоксичны, не вызывают побочных эффектов при применении, легко доступны в препаративных количествах в виде рекомбинантных белков. Комбинированное применение препаратов направленного действия и антиангиогенных белков позволяет добиться разнонаправленного воздействия на опухоль – поражения опухолевых клеток и дезинтеграции опухолевой кровеносной сети. В перспективе клиническое применение комбинированной терапии может позволить: избирательно поражать опухолевые клетки, не затрагивая нормальные ткани; преодолевать врожденную и приобретенную множественную лекарственную устойчивость; значительно снизить терапевтические дозы и побочные эффекты химиопрепаратов; разрушать опухолевую кровеносную сеть; препятствовать метастазированию; прекращать процесс разрастания регионарных метастазов.

Таким образом, комплексные средства, включающие препараты направленного действия и антиангиогенные агенты, принадлежат к терапевтическим средствам нового поколения и имеют чрезвычайно высокий потенциал. Достаточно простые технологии получения предполагают возможность организации промышленного производства

антиангиогенных белков и препаратов направленного действия и позволяют рассматривать эти препараты в качестве перспективных лекарственных средств, которые могут не только существенно повысить эффективность противоопухолевой терапии, но и найти применение в других областях медицины.

В целом можно предполагать, что препараты направленного действия, в составе которых цитокины и другие белки используются в качестве векторных молекул, несущих цитотоксический агент, будут все шире применяться в клинике для терапии онкологических заболеваний и заболеваний, связанных с нарушениями ангиогенеза. В ближайшей перспективе следует ожидать роста доли различных инновационных высокоэффективных нанопрепаратов на мировом фармацевтическом рынке. Продукты нанотехнологии также будут все шире применяться в диагностике заболеваний и биомедицинских исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для создания терапевтических препаратов нового поколения, обладающих низкой токсичностью, высокой биодоступностью, избирательностью и эффективностью действия, требуются объединенные усилия специалистов, работающих в различных областях фундаментальных и прикладных наук.

Очевидно, что после определения объекта терапии необходим глубокий анализ имеющихся в научной литературе данных о молекулярных механизмах возникновения и течения заболевания и возможностях воздействия на этот процесс. Определение молекулярных мишеней терапевтического воздействия позволяет не только планировать химический, пептидный или полимерный дизайн препарата, но и наносить точечные удары по наиболее уязвимым местам проявления патологии, не затрагивая при этом здоровые клетки организма. В настоящее время в мире сотрудниками ряда научно-исследовательских коллективов уже осуществлена разработка терапевтических препаратов нового поколения различных классов, включая конъюгаты лекарственных агентов с белковыми векторами и полимерными носителями, наночастицы, наносферы, нанокристаллы, липосомы, полимерные мицеллы, средства доставки генетического материала, ингибиторы различных этапов клеточных сигнальных каскадов и др. Многие из этих препаратов проходят клинические испытания, а некоторые уже вышли на фармацевтический рынок. Очевидно, что дальнейшие работы в области создания высокоэффективных препаратов нового поколения имеют огромное теоретическое и прикладное значение, и в ближайшем будущем фронт этих работ будет стремительно расширяться, требуя привлечения большого числа молодых высококвалифицированных специалистов из различных областей биомедицинских наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abe S. and Otsuki M. // *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 2002, v. 2(6), p. 715-726.
2. Abelson J. and Collins P.A. // *Healthc Policy*, 2009, v. 4(3), p. e113-e128.
3. Aboud-Pirak E. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, v. 86, p. 3778-3781.
4. Alt F.W. et al. // *J. Biol. Chem.*, 1978, v. 253, p. 1357-1370.
5. Amaral A.C. et al. // *J. Antimicrob. Chemother.*, 2009, v. 63(3), p. 526-533.
6. Amirshahi N. et al. // *Arch. Med. Res.*, 2008, v. 39(6), p. 549-559.
7. Amlot P.L. et al. // *Blood*, 1993, v. 82, p. 2624-2633.
8. Bagnato A. and Spinella F. // *Trends Endocrinol. Metabol.*, 2003, v. 14(1), p. 44-50.
9. Barroug A. et al. // *J. Orthop. Res.*, 2004, v. 22(4), p. 703-708.
10. Baselga J. et al. // *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2002, v. 21, p. 226a.
11. Batist G. et al. // *Expert Opin. Pharmacother.*, 2002, v. 3(12), p. 1739-1751.
12. Batra J.K. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, V. 86, P. 8545-8549.
13. Batrakova E.V. et al. // *Br. J. Cancer*, 1996, v. 74, p. 1545-1552.
14. Beerli R. and Hynes N. // *J. Biol. Chem.*, 1996, v. 271, p. 6071-6076.
15. Benhar I. et al. // *Int. J. Cancer*, 1995, v. 62, p. 351-355.
16. Bentolila L.A. et al. // *J. Nucl. Med.*, 2009, v. 50(4), p. 493-496.
17. Bhattacharya R. and Mukherjee P. // *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, v. 60(11), p. 1289-1306.
18. Bianco A. et al. // *J. Pept. Sci.*, 2001, v. 7(4), p. 208-219.
19. Biedler J.L. and Spengler B.A. // *Science*, 1976, v. 191, p. 185-187.
20. Bissell M.J. // *Am. J. Pathol.*, 1999, v. 155, p. 675-679.
21. Bohl Kullberg E. et al. // *Bioconjug. Chem.*, 2002, v. 13(4), p. 737-743.
22. Bolten B.M. and Georgeo T. // *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2002, v. 1, p. 335-336.
23. Bomsel M. and Mostov K. // *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1991, v. 3, p. 647-653.
24. Bonifazi D. et al. // *Chem. Soc. Rev.*, 2007, v. 36(2), p. 390-414.
25. Booser D.J. et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2002, v. 50(1), p. 6-8.
26. Borst P. // *Rev. Oncol.*, 1991, v. 4, p. 87-105.
27. Bosmann H.B. // *Nature*, 1971, v. 233, p. 566-569.
28. Bot A.I. et al. // *Pharm. Res.*, 2000, v. 17(3), p. 275-283.
29. Breitz H.B. et al. // *Clin. Nucl. Med.*, 1997, v. 22(9), p. 615-620.
30. Briest S. and Stearns V. // *Clin. Adv. Hematol. Oncol.*, 2009, v. 7(3), p. 185-192.
31. Broxterman H.J. et al. // In: Mihich E., ed. *Pezcoller Found Symposium*, v. 1. *Drug Resistance: Mechanisms and Reversal*. Roma: John Libbey CIC, 1990, p. 309-319.
32. Bue P. et al. // *Cancer*, 1997, v. 80(12), p. 2385-2389.
33. Burnet F.M. // *Prog. Exp. Tumor Res.*, 1970, v. 13, p. 1-27.
34. Burtess B.A. et al. // *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2002, v. 21.
35. Cai W. et al. // *Nano Lett.*, 2006, v. 6(4), p. 669-676.
36. Campone M. et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2007, v. 60(4), p. 523-533.
37. Carriquiry M. et al. // *J. Dairy Sci.*, 2009, v. 92(10), p. 4865-4875.
38. Carter S.K. // *Cancer Treat. Rev.*, 1984, v. 11 (S), p. 3-7.
39. Casamassimi A. et al. // *Ann Oncol.*, 2000, v. 11(3), p. 319-325.
40. Casiday R. and Frey R. // <http://www.chemistry.wustl.edu>, 2000.
41. Cengelli F. et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2006, v. 318(1), p. 108-116.
42. Chan H.S.L. et al. // *N. Engl. J. Med.*, 1991, v. 325, p. 1608-1614.
43. Chan H.S.L. et al. // *J. Clin. Oncol.*, 1990, v. 8, p. 689-704.
44. Chen C. et al. // *Cell*, 1986, v. 47, p. 381-389.
45. Chen C. et al. // *Biomaterials*, 2009, v. 30(15), p. 2912-2918.
46. Chen J. et al. // *Nano Lett.*, 2005, v. 5(3), p. 473-477.
47. Chen Y.-N. et al. // *J. Biol. Chem.*, 1990, v. 265, p. 10073-10080.
48. Cheng X. and Kuhn L. // *Int. J. Nanomedicine*, 2007, v. 2(4), p. 667-674.
49. Cheung K.C. et al. // *Leuk. Lymphoma*, 2008, v. 49(3), p. 596-597.
50. Chhabra R. et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2007, v. 620, p. 107-116.
51. Chiribiri A. et al. // *Am. J. Cardiol.*, 2008, v. 101(3), p. 407-412.
52. Choi S.H. and Park T.G. // *Int. J. Pharm.*, 2006, v. 311(1-2), p. 223-228.
53. Chowdhury P.S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, v. 95, p. 669-674.
54. Cole S.P.C. et al. // *Science*, 1992, v. 258, p. 1650-1654.
55. Colton H.M. et al. // *Toxicol. Sci.*, 2004, v. 80(1), p. 183-192.

56. Constantinides P.P. // *Pharm. Res.*, 1995, v. 12(11), p. 1561-1572.
57. Constantinides P.P. et al. // *Pharm. Res.*, 1996, v. 13(2), p. 210-215.
58. Corchero J.L. and Villaverde A. // *Trends Biotechnol.*, 2009, v. 27(8), p. 468-476.
59. Cordon-Cardo C. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, v. 86, p. 695-698.
60. Cui F. et al. // *Biomacromolecules*, 2009, v. 10(5), p. 1253-1258.
61. Curran M.P. and Robinson D.M. // *Drugs*, 2009, v. 69(13), p. 1853-1878.
62. Damle B. et al. // *J. Pharm. Pharmacol.*, 2000, v. 52, p. 671-678.
63. Dang N.H. et al. // *J. Clin. Oncol.*, 2004, v. 22, p. 4095-4102.
64. Daniell M.D. and Hill J.S. // *Austral. and New Zealand J. Surgery*, 1991, v. 61, p. 340-348.
65. Davis D.W. et al. // *Clin. Cancer Res.*, 2005, v. 11, p. 678-689.
66. Davis F.F. // *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2003, v. 519, p. 51-58.
67. de Bruijn I.A. et al. // *Vaccine*, 2006, v. 24(44-46), p. 6629-6631.
68. de Farias P.M. et al. // *J. Biomed Opt.*, 2005, v. 10(4), p. 44023.
69. de Jong J.S. et al. // *J. Pathol.*, 1998, v. 184, p. 53-57.
70. De Lange R.J. and Huang T.S. // *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246(3), p. 698-709.
71. Demant E.J.F. et al. // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1990, v. 1055, p. 117-125.
72. Dewhirst M.W. et al. // *Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys.* 1989, 17, 91-99.
73. Diagaradjane P. et al. // *Clin. Cancer Res.*, 2008, v. 14(3), p. 731-741.
74. Dinesen L. and Travis S. // *Int. J. Nanomed.*, 2007, v. 2(1), p. 39-47.
75. Duncan R. // *Nature*, 2006, v. 6, p. 688-701.
76. Duncan R.J.S. et al. // *Nucleotides & nucleotides*, 1992, v. 11(5), p. 1003-1007.
77. Dunn W.A. and Hubbard A.L. // *J. Cell. Biol.*, 1984, v. 98, p. 2148-2159.
78. Dupont B. // *J. Antimicrob. Chemother.*, 2002, v. 49(1), p. 31-36.
79. Dupuy A.M. et al. // *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2005, v. 43(12), p. 1291-1302.
80. Dvorak H.F. et al. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1999, v. 237, p. 97-132.
81. Ehrlich P. // *Proc. Roy. Soc.* 1900, v. 66, p. 424-448.
82. Elbayoumi T.A. et al. // *J. Liposome Res.*, 2007, v. 17(1), p. 1-14.
83. Engert A. et al. // *Blood*, 1997, v. 89, p. 403-410.
84. Epstein C. et al. // *Int. J. Cancer*, 1994, v. 8, p. 57-59.
85. Esmaeli B. et al. // *Ann. Oncol.*, 2009, v. 20(4), p. 709-714.
86. Esposito E. et al. // *Pharm. Res.*, 2005, v. 22(12), p. 2163-2173.
87. Fearon E.R. and Vogelstein B. // *Cell*, 1990, v. 61, p. 759-767.
88. Feldman N.B. et al. // *Biochem. (Moscow)*, 2000, v. 65(8), p. 967-971.
89. Ferrara N. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, v. 333(2), p. 328-335.
90. Firestone R.A. et al. // *J. Control. Release*, 1996, v. 39, p. 251-259.
91. Flenniken M.L. et al. // *Chem. Biol.*, 2006, v. 13, p. 161-170.
92. Folberg R. et al. // *Am. J. Pathol.*, 2000, v. 156, p. 361-381.
93. Ford J.M. and Hait W.N. // *Pharmacol Rev.*, 1990, v. 42, p. 155-199.
94. Foss F.M. et al. // *Clin. Lymphoma*, 2001, v. 1, p. 298-302.
95. Foss F.M. et al. // *Berlin, Germany: Springer-Verlag*, 1998, p. 63-81.
96. Fox S.B. et al. // *J. Pathol.*, 1996, v. 179, p. 232-237.
97. Frankel A.E. et al. // *Clin. Cancer Res.*, 2003, v. 9, p. 3555-3561.
98. Frankel A.E. et al. // *Leuk. Lymphoma*, 1997, v. 26, p. 287-298.
99. Frankel A.E. et al. // *Clin. Cancer Res.*, 2002, v. 8, p. 1004-1013.
100. Fraumeni J.F. . et al. // In: DeVita V.T. Jr., Hellman S., Rosenberg S.A., eds. *Cancer. Principles and Practice of Oncology*. Vol 1. 4th ed. Philadelphia: Lippincott 1993, p. 150-181.
101. French A.R. et al. // *J. Biol. Chem.*, 1994, v. 269, p. 15749-15755.
102. Fukumura D. and Jain R.K. // *Cancer and Metastasis Rev.*, 1998, v. 17, p. 77-89.
103. Gabizon A. // *Clin. Cancer Res.*, 2001, v. 7, p. 223-225.
104. Gelmon K. et al. // *Invest. New Drugs*, 2004, v. 22(3), p. 263-275.
105. Gigli M. et al. // *Cancer Res.*, 1989, v. 49, p. 560-564.
106. Gijssens A. et al. // *Cancer Res.*, 2000, v. 60(8), p. 2197-2202.
107. Goasguen J.E. et al. // *Blood*, 1993, v. 81, p. 2394-2398.
108. Goldberg M.R. et al. // *Clin. Cancer Res.*, 1995, v. 1, p. 57-61.
109. Goldenberg D.M. et al. // *J. Nucl. Med. Technol.*, 1997, v. 25(1), p. 18-23.
110. Goldie J.H. and Coldman A.J. // *Cancer Treat. Rep.* 1979, v. 63, p. 1727-1733.
111. Goldie J.H. and Coldman A.J. // *Cancer Res.*, 1984, v. 44, p. 3643-3653.

112. Goldman C.K. et al. // *Mol. Biol. Cell*, 1993, v. 4, p. 121–133.
113. Goldstein L.J. et al. // *JNCI*, 1989, v. 81, p. 116-124.
114. Gooding J.J. and Shapter J.G. // *Methods Mol. Biol.*, 2005, v. 300, p. 225-2241.
115. Gottesman M.M. // *Cancer Res.*, 1993, v. 53, p. 747-754.
116. Graham M.L. // *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, v. 55, p. 1293-1302.
117. Gramoun A. et al. // *J. Cell Biochem.*, 2007, v. 102(2), p. 341-352.
118. Grant C.E. et al. // *Cancer Res.*, 1994, v. 54, p. 357-361.
119. Grogan T.M. et al. // *Blood*, 1993, v. 81, p. 490-495.
120. Grossbard M.L. et al. // *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 1998, v. 17, p. 3a.
121. Haggerty H.G. et al. // *Toxicol. Pathol.*, 1999, v. 27, p. 87-94.
122. Hamman P.R. et al. // *Bioconjug. Chem.*, 2002, v. 13, p. 40–46.
123. Hanahan D. and Weinberg R.A. // *Cell*, 2000, v. 100(1), p. 57-70.
124. Harn N.R. et al. // *J. Pharm. Sci.*, 2005, v. 94(11), p. 2487-2495.
125. Harris A.L. // *Cancer Surv.*, 1985, v. 4, p. 601-624.
126. Hartman K.B. et al. // *Small*, 2007, v. 3(9), p. 1496-1499.
127. Hashida S. et al. // *J. Appl. Biochem.*, 1984, v. 6, p. 56–63.
128. Hawkins M.J. et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, v. 60(8), p. 876-885.
129. Hekis J.V. et al. // *Mol. Reprod. Dev.*, 1995, v. 41, p. 149-156.
130. Hicklin D.J. et al. // *Drug Discovery Today*, 2001, v. 6, p. 517–528.
131. Hindenburg A.A. et al. // *Cancer Res.*, 1989, v. 49, p. 4607-4614.
132. Homolya L. et al. // *J. Biol. Chem.*, 1993, v. 268, p. 21493-21496.
133. Husain S.R. and Puri R.K. // *Clin. Cancer Res.*, 1999, v. 5, p. 3766.
134. Iijima S. // *Nature*, 1991, v. 354, p. 56-58.
135. Inoue K. et al. // *Clin. Cancer Res.*, 2000, v. 6, p. 4874-4884.
136. Jackle. et al. // *Biol. Chem.*, 1991, v. 266, p. 1396-1402.
137. Jain R.K. // *Cancer Res.*, 1988, v. 48, p. 2641-2658.
138. Jain R.K. // *Ann. Biomed. Eng.*, 1996, v. 24, p. 457–473.
139. Jayagopal A. et al. // *Bioconjug. Chem.*, 2007, v. 18(5), p. 1424-1433.
140. Jazirehi A.R. and Bonavida B. // *Oncogene*, 2005, v. 24(13), p. 2121-2143.
141. Juliano R.L. and Ling V. // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1976, v. 455, p. 152-162.
142. Jung Y.D. et al. // *Eur. J. Cancer*, 2002, v. 38, p. 1133-1140.
143. Junghanns J.U. and Müller R.H. // *Int. J. Nanomedicine*, 2008, v. 3(3), p. 295-309.
144. Junyaprasert V.B. et al. // *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 2007, v. 10(3), p. 288-298.
145. Juranka P.F. et al. // *FASEB J.*, 1989, v. 3, p. 2583-2592.
146. Kahan B.D. // *Expert Opin. Pharmacother.*, 2001, v. 2(11), p. 1903-1917.
147. Kallioniemi O.P. // *Ann. Med.*, 2001, v. 33(2), p. 142-147.
148. Kamesaki S. et al. // *Cancer Res.*, 1993, v. 53, p. 4251-4256.
149. Kaminski M. // *Cancer Biol. Ther.*, 2007, v. 6(7), p. 996-997.
150. Kato Y. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1992, v. 89(18), p. 8507-8511.
151. Katti K.S. et al. // *Biomed. Mater.*, 2008, v. 3(3), p. 034122.
152. Kawasaki T. and Ashwell G. // *J. Biol. Chem.*, 1976a, v. 251, p. 5292-5299.
153. Keam S.J. et al. // *Drugs*, 2003, v. 63(22), p. 2521-2554.
154. Kessel D. // *Oncology Res.*, 1992, v. 4, p. 219-225.
155. Khandare J.J. and Minko T. // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 2006, v. 23(5), p. 401-35.
156. Kim D.W. et al. // *Ann. Oncol.*, 2007, v. 18(12), p. 2009-2014.
157. King H.D. et al. // *Bioconj. Chem.*, 1999, v. 10, p. 279–288.
158. Kogan M.J. et al. // *Nanomed.*, 2007, v. 2(3), p. 287-306.
159. Köhler G. and Milstein C. // *Nature*, 1975, v. 256(5517), p. 495-497.
160. Kong S.Y. et al. // *Yao Xue Xue Bao*, 2009, v. 44(1), p. 85-90.
161. Koo O.M. et al. // *Nanomedicine*, 2005, v. 1(1), p. 77-84.
162. Koontz B.F. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2008, v. 71(2), p. 358-361.
163. Korn A.H. et al. // *J. Mol. Biol.*, 1972, v. 65(3), p. 525-529
164. Korsmeyer S.J. // *Blood*, 1992, v. 80, v. 879-886.
165. Kotiaho A. et al. // *Langmuir*, 2007, v. 23(26), p. 13117-13125.
166. Kraus M.H. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, v. 86, p. 9193-9197.
167. Kreitman R.J. et al. // *N. Engl. J. Med.*, 2001, v. 345, p. 241-247.
168. Kreitman R.J. et al. // *Blood*, 1999, v. 94, p. 3340-3348.

169. Kreitman R.J. et al. // J. Clin. Oncol., 2000, v. 18, p. 1622-1636.
170. Kripp M. and Hofheinz R.D. // Int. J. Nanomed., 2008, v. 3(4), p. 397-401.
171. Kulik G. et al. // Mol. Cell Biol., 1997, v. 17, p. 1595-1606.
172. Kunwar S. // In: Westphal M., Tonn J.C., Ram Z., eds. Local Therapies for Glioma: Present Status and Future Developments // Vienna, Austria: Springer-Verlag Wien, 2003, p. 105-111.
173. Kurakhmaeva K.B. et al. // Bull. Exp. Biol. Med., 2008, v. 145(2), p. 259-262.
174. Kurz H. // J. Neuro Oncol., 2000, v. 50, p. 17-35.
175. Kyslova O.V. et al. // Fiziol. Zh., 2007, v. 53(3), p. 78-81.
176. Lampidis T.J. et al. // Biochem. Pharmacol., 1989, v. 38, p. 4267-4271.
177. Langer C.J. et al. // Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 2005, v. 96, abstract LBA7011.
178. Lankelma J. et al. // Biochim. Biophys. Acta., 1991, v. 1093, p. 147-152.
179. Laptev R. et al. // Br. J. Cancer, 2006, v. 95(2), p. 189-196.
180. Laske D.W. et al. // Neurosurgery, 1997, v. 41, p. 1039-1049.
181. Laske D.W. et al. // Nat. Med., 1997, v. 3, p. 1362-1368.
182. Le Gac S. et al. // Nano Lett., 2006, v. 6(9), p. 1863-1869.
183. Leonard J.P. and Link B.K. // Semin. Oncol., 2002, v. 29(1), p. 81-86.
184. Linn S.C. et al. // Forum, 1992, v. 2, p. 642-657.
185. Linn S.C. et al. // J. Clin. Oncol., 1994, v. 12, p. 812-819.
186. Liu J. et al. // Int. J. Pharm., 2008, v. 356(1-2), p. 333-344.
187. Liu K.X. et al. // Pharm. Res., 1995, v. 12(11), p. 1737-1740.
188. Liu T.F. et al. // Bioconjug. Chem., 2003, v. 14(6), p. 1107-1114.
189. Lowe S.W. et al. // Cell, 1993, v. 74, p. 957-967.
190. Lutsenko S.V. et al. // J. Drug Target., 2002, vl. 10(7), p. 567-571.
191. Lutsenko S.V. et al. // Tumor Biol., 2000, v. 21(6), p. 367-374.
192. Lutsenko S.V. et al. // Tumor biol., 1999, v. 20(4), p. 218-224.
193. Lynch T.J. et al. // J. Clin. Oncol., 1997, v.15, p. 723-734.
194. Maitra A. // Expert Rev. Mol. Diagn., 2005, v. 5(6), p. 893-905.
195. Malik N. et al. // Anticancer Drugs, 1999, v. 10, p. 767-776.
196. Manchester M. and Singh P. // Adv. Drug Deliv. Rev., 2006, v. 58, p. 1505-1522.
197. Mane J.-P. et al. // Leukemia, 1993, v. 7, p. 825-831.
198. Mane J.-P. et al. // Blood, 1991, v. 78, p. 586-592.
199. Markelov M.L. et al. // Ter. Arkh., 2008, v. 80(4), p. 79-85.
200. Maruyama K. et al. // Biochem. Biophys. Acta., 1995, v. 1234, p. 74-80.
201. Matějka V. et al. // J. Nanosci. Nanotechnol., 2006, v. 6(8), p. 2484-2488.
202. McCarthy J.R. and Weissleder R. // Adv. Drug Deliv. Rev., 2008, v. 60(11), p. 1241-1251.
203. McVie J.G. Drug disposition and pharmacology // In: Fox B.W., Fox M., eds. Antitumor Drug Resistance. Berlin: Springer-Verlag, 1984, p. 39-66.
204. Medintz I.L. et al. // Int. J. Nanomedicine, 2008, v. 3(2), p. 151-167.
205. Meerum Terwogt J.M. et al. // Anticancer Drugs, 2001, v. 12, p. 315-323.
206. Meijer D.K. and Molema G. // Semin. Liver Dis., 1995, v. 15, p. 202-256.
207. Meilander N.J. et al. // J. Control. Release, 2003, v. 88(2), p. 321-331.
208. Meilander N.J. et al. // J. Control Release, 2001, v. 71(1), p. 141-152.
209. Miilder H.S. et al. // Eur. J. Biochem., 1993, v. 218, p. 871-882.
210. Misra R.D. // Nanomed., 2008, v. 3(3), p. 271-274.
211. Mitton D. and Ackroyd R. // Photodiagnosis Photodyn. Ther., 2008, v. 5(2), p. 103-111.
212. Moan J. // J. Photochem. Photobiol., 1990, v. 5, p. 521-524.
213. Molineux G. // Curr. Pharm. Des., 2004, v. 10, p. 1235-1244.
214. Molloy R.M. et al. // Clin. Chem. Lab. Med., 2005, v. 43(12), p. 1303-1313.
215. Moscow J.A. et al. // Cancer Res., 1989, v. 49, p. 1422-1428.
216. Mu L. et al. // Int. J. Pharm., 2005, v. 306(1-2), p. 142-149.
217. Multani P.S. et al. // Clin. Cancer Res., 1998, v. 4, p. 2599-2604.
218. Mundargi R.C. et al. // J. Control Release, 2008, v. 125(3), p. 193-209.
219. Nakanishi T. et al. // J. Control. Release, 2001, v. 74, p. 295-302.
220. Namdeo M. et al. // J. Nanosci. Nanotechnol., 2008, v. 8(7), p. 3247-3271.
221. Neyfakh A.A. // Exp. Cell Res., 1988, v. 174, p. 168-176.
222. Ng M. and Cunningham D. // Int. J. Clin. Pract., 2004, v. 58(10), p. 970-976.
223. Noonan K.E. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, v. 87, p. 7160-7164.

224. Novodarova G.N. et al. // 6th Intern. Symposium, Noordwijkerhout 1996, p. 215-216.
225. O'Toole J.E. et al. // Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1998, v. 234, p. 35-56.
226. O-charoenrat P. et al. // Clin. Exp. Metastasis, 2000, v. 18, p. 155-161.
227. O-charoenrat P. et al. // Oral Oncol., 2002, v. 38, p. 73-80.
228. Onda M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, v. 105(32), p. 11311-11316.
229. Ord J.J. et al. // Br. J. Cancer, 2005, v. 92, p. 2140-2147.
230. Ortel B. et al. // Front Biosci., 2009, v. 14, p. 4157-4172.
231. Osborne C.K. and Coronado-Heinsohn E. // Cancer J. Sci. Am., 1996, v. 2(3), p. 175-180.
232. Osharov N. et al. // J. Biol. Chem., 1993, v. 268(15), p. 11134-11142.
233. Ozols R.F. and Young R.C. // Semin. Oncol., 1984, v. 11, p. 251-263.
234. Ozpolat B. et al. // J. Pharm. Pharm. Sci., 2003, v. 6(2), p. 292-301.
235. Pai L.H. et al. // Nat. Med., 1996, v. 2(3), p. 350-335.
236. Pai-Scherf L.H. et al. // In: Rosenberg S.A., ed. Principles and Practice of the Biologic Therapy of Cancer. 3rd ed. // Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 382-395.
237. Pai-Scherf L.H. et al. // Clin. Cancer Res., 1999, v. 5, p. 2311-2315.
238. Papagiannaros A. et al. // Nanomedicine, 2009, v. 5(2), p. 216-224.
239. Pardridge W.M. // Semin. Cell Biol., 1991, v. 2(6), p. 419-26.
240. Pardridge W.M. Receptor-mediated transcytosis of peptides through the blood-brain barrier // In: Peptide Drug Delivery to the Brain, Pardridge, W.M., ed., Raven Press, New York, 1991, 160 p.
241. Pendleton J.M. et al. // BMC Cancer, 2008, v. 8, p. 132.
242. Peng X.H. et al. // Int. J. Nanomedicine, 2008, v. 3(3), p. 311-321.
243. Perales J.C. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994a, v. 91, p. 4086-4090.
244. Perales J.C. et al. // Eur. J. Biochem., 1994, v. 226, p. 255-266.
245. Perry T.E. et al. // Prostate, 1998, v. 35, p. 117-124.
246. Peterson R.H.F. and Biedler J.L. // J. Supramol. Struct., 1978, v. 9, p. 289-298.
247. Petre C.E. and Dittmer D.P. // Int. J. Nanomed., 2007, v. 2(3), p. 277-288.
248. Pileri S.A. et al. // Histopathology, 1991, v. 19, p. 131-140.
249. Pirker R. et al. // JNCI, 1991, v. 83, p. 708-712.
250. Plate K. // Nat. Med., 2001, v. 7, p. 151-152.
251. Posey J.A. et al. // Clin. Cancer Res., 2002, v. 8, p. 3092-3099.
252. Posey J.A. et al. // Cancer Biother. Radiopharm., 2001, v. 16, p. 125-132.
253. Prato M. et al. // Acc. Chem. Res., 2008, v. 41(1), p. 60-68.
254. Puri R.K. et al. // Blood, 1996, v. 87, p. 4333-4339.
255. Pytel D. et al. // Anticancer Agents Med. Chem., 2009, v. 9(1), p. 66-76.
256. Qiu J. et al. // Acta. Pharmacol. Sin., 2005, v. 26(11), p. 1395-1401.
257. Quiram P.A. et al. // Retina, 2008, v. 28(3), p. S8-12.
258. Rademaker-Lakhai J.M. et al. // Clin. Cancer Res., 2004, v. 10, p. 3386-3395.
259. Rand R.W. et al. // Clin. Cancer Res., 2000, v. 6, p. 2157-2165.
260. Ravi P. et al. // J. Nanosci. Nanotechnol., 2007, v. 7(4-5), p. 1176-1196.
261. Ravindranath N. et al. // J. Androl., 2001, v. 22, p. 432-443.
262. Rawat M. et al. // Yakugaku Zasshi, 2008, v. 128(2), p. 269-280.
263. Rawat M. et al. // Biol. Pharm. Bull., 2006, v. 29(9), p. 1790-1798.
264. Reddy K.R. et al. // Adv. Drug Del. Rev., 2002, v. 54, p. 571-586.
265. Reddy L.H. et al. // Pharm. Dev. Technol., 2006, v. 11(2), p. 167-177.
266. Renthall R. et al. // Biochim. Biophys. Acta, 1987, v. 897(3), p. 384-394.
267. Rivera F. et al. // Acta Oncol., 2008, v. 47(1), p. 9-19.
268. Robertson C.A. et al. // J. Photochem. Photobiol. B., 2009, v. 96(1), p. 1-8.
269. Rocha-Lima C.M. et al. // Cancer Control, 2007, v. 14(3), p. 295-304.
270. Rose P.G. // Oncologist, 2005, v. 10(3), p. 205-214.
271. Rosen Y. and Elman N.M. // Expert Opin. Drug Deliv., 2009, v. 6(5), p. 517-530.
272. Ross D.D. et al. // Blood, 1993, v. 82, p. 1288-1299.
273. Ross H.J. et al. // Lung Cancer, 2006, v. 54(1), p. 69-77.
274. Ross R.J. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab., 2001, v. 86(4), p. 1716-1723.
275. Rowinsky E.K. et al. // J. Clin. Oncol., 2003, v. 21, p. 148-157.
276. Rózsa L. and Nixdorff K. // In: Deadly Cultures: the History of Biological Weapons since 1945. Wheelis M., Rózsa L., Dando M. (eds.), Harvard University Press, 2006, p. 157-168.
277. Rubenstein M. et al. // Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 2002, v. 24(10), p. 649-652.

278. Saito G. et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2003, v. 55, p. 199–215.
279. Saltz L. et al. // *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 2001, v. 20, p. 3a.
280. Sampson J.H. et al. // *J. Neurooncol.*, 2003, v. 65, p. 27-35.
281. Sanfilippo O. et al. // *Eur. J. Cancer*, 1991, v. 27, p. 155-158.
282. Santangelo R. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, v. 44(9), p. 2356-2360.
283. Sarapa N. et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2003, v. 52(5), p.424-430.
284. Sarris A.H. et al. // *Ann. Oncol.*, 2000, v. 11(1), p. 69-72.
285. Sausville E.A. et al. // *Blood*, 1995, v. 85, p. 3457-3465.
286. Savitsky A.A. et al. // *Biochem. (Moscow)*, 2000, v. 65(6), p. 732-736.
287. Sawamura T. et al. // *Gastroenterology*, 1981, v. 81, p. 527-533.
288. Schaal A.D. // *Clin. J. Oncol. Nurs.*, 2005, v. 9(5), p. 630-632.
289. Scheper R.J. et al. // *Cancer Res.*, 1993, v. 53, p. 1475-1479.
290. Schnell R. et al. // *Clin. Cancer Res.*, 2002, v.8, p. 1779-1786.
291. Schnell R. et al. // *Leukemia*, 2000, v. 14, p. 129-135.
292. Schreiber A.B. et al. // *Science*, 1986, v. 232, p. 1250-1253.
293. Schroeder J.E. et al. // *J. Control. Release*, 2007, v. 124(1-2), p. 28-34.
294. Schuurhuis G.J. et al. // *JNCI*, 1989, v. 81, p. 1887-1982.
295. Schuurhuis G.J. et al. // *Exp. Hematol.*, 1993, v. 21, p. 1079.
296. Schuurhuis G.J. et al. // *Br. J. Cancer*, 1993, v. 68, p. 898-908.
297. Sedlacek H.H. et al. // In: Huber, H., Queiber (Eds.), *Oncology*, Karger, 1992, v. 43, p. 75-82.
298. Serpone N. et al. // *Inorg. Chim. Acta.*, 2007, v. 360, p. 794–802.
299. Severin S.E. et al. // *Tumor Targeting*, 1996, №2, p. 299-306.
300. Seymour L.W. et al. // *J. Clin. Oncol.*, 2002, v. 20(6), p. 1668-1676.
301. Seymour L.W. et al. // *Br. J. Cancer*, 1991, v. 63, p. 859-899.
302. Sharkey R.M. and Goldenberg D.M. // *CA Cancer J. Clin.*, 2006, v. 56, p. 226-243.
303. Shen L.F. et al. // *Chin. Med. J. (Engl)*, 2006, v. (15), p. 1287-1293.
304. Shim S.Y. et al. // *Nanomed.*, 2008, v. 3(2), p. 215-232.
305. Shimizu A. and Kawashima S. // *J. Biol. Chem.*, 1989, v. 264, p. 13632-13638.
306. Shirakawa K. et al. // *Int. J. Cancer*, 2002, v. 99, p. 821-828.
307. Shive M.S. and Anderson J.M. // *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1997, v. 28(1), p. 5-24.
308. Sikic B.I. // *J. Clin. Oncol.*, 1993, v. 11, p. 1629-1635.
309. Simonnet J.-T. and Richart P. // *US Patent №6379683*, 2002.
310. Simonnet J.-T. et al. // *US Patent № 6565886*, 2003.
311. Singer J.W. et al. // *J. Control. Release*, 2001, v. 74(1-3), p. 243-247.
312. Sitaraman S.V. et al. // *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2003, v. 4(11), p. 1363-1368.
313. Skrabalak S.E. et al. // *Adv. Mater. Deerfield.*, 2007, v. 19(20), p. 3177-3184.
314. Skrabalak S.E. et al. // *Acc. Chem. Res.*, 2008, v. 41(12), p. 1587-1595.
315. Spargo B.J. et al. // *J. Microencapsul.*, 1995, v. 12(3), p. 247-254.
316. Spikes J.D. and Jori G. // *Lasers Med. Sci.*, 1986, v. 2, p. 3-15.
317. Stan A.C. et al. // *Cancer Res.*, 1999, v. 59, p. 115–121.
318. Stone M.J. et al. // *Blood*, 1996, v. 88, p. 1188-1197.
319. Stretch J.R. et al. // *Cancer Res.*, 1991, v. 51, p. 5976-5979.
320. Strom T.B. et al. // *Ann. NY Acad. Sci.*, 1991, v. 636, p. 233-250.
321. Stsiapura V. et al. // *Anal. Biochem.*, 2004, v. 334(2), p. 257-265.
322. Su W.T. et al. // *Am. Surg.*, 2001, v. 67(12), p. 1200-1203.
323. Subedi R.K. et al. // *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2009, v. 37(3-4), p. 508-513.
324. Sugiyama Y. and Kato Y. // In: *Peptide-Based Drug Design: Controlling Transport and Metabolism*, Taylor M.D. and Amidon G.L., eds., American Chemical Society, Washington, D.C., 1995, 525 p.
325. Sun C. et al. // *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, v. 60(11), p. 1252-1265.
326. Takahashi T. et al. // *Cancer*, 1988, v. 61, p. 881-888.
327. Tanaka T. et al. // *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, v. 24(3), p. 268-273.
328. Tanaka T. et al. // *Biol. Pharm. Bull.*, 1996, v. 19(5), p. 774-777.
329. Tannok I. et al. // *Cell Pharmacol.*, 1995, v. 2, p. 193–198.
330. Taupitz M. et al. // *Rofo*, 2003, v. 175(6), p. 752-765.
331. Tenne R. and Rao C.N. // *Philos. Transact. Math. Phys. Eng. Sci.*, 2004, v. 362, p. 2099-2125.
332. Tenne R. // *Nat. Nanotechnol.*, 2006, v. 1(2), p. 103-111.
333. Tepler I. et al. // *Cancer*, 1994, v. 73, p. 1276-1285.

334. Tholouli E. et al. // J. Pathol., 2008, v. 216(3), p. 275-285.
335. Torchilin V. // The AAPS J., 2007, v. 9(2), p. E128-E147.
336. Torchilin V.P. // Pharm. Res., 2007, v. 24(1), p. 1-16.
337. Torchilin V.P. et al. // FASEB J., 1992, v. 6, p. 2716-2719.
338. Torrado J.J. et al. // J. Pharm. Sci., 2008, v. 97(7), p. 2405-2425.
339. Torrani Cerenzia M. et al. // Hepatology, 1996, v. 23(4), p. 657-661.
340. Trail P.A. and Bianchi A.B. // Curr. Opin. Immunol., 1999, v. 11, p. 584-588.
341. Trikha M. et al. // Curr. Opin. Biotechnol., 2002, v. 13, p. 609-614.
342. Tritton T.R. and Yee G. // Science, 1982, v. 217, p. 248-250.
343. Trouet A. and Jolles, G. // Seminars in Oncology, 1984, v. 11, p. 64.
344. Trouet A. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79(2), p. 626-629.
345. Tsuruo T. et al. // Cancer Res., 1981, v. 41, p. 1967-1972.
346. Tursilli R. et al. // J. Pharm. Biomed. Anal., 2006, v. 40(4), p. 910-914.
347. Tziomalos K. and Athyros V.G. // Int. J. Nanomedicine, 2006, v. 1(2), p. 129-147.
348. Uchio E.M. et al. // J. Urol., 2003, v. 169, p. 357-360.
349. Uckun F. // Br. J. Haematol., 1993, v. 85, p. 435-438.
350. Uckun F.M. et al. // Clin. Cancer Res., 1998, v. 4(5), p. 1125-1134.
351. Uner M. // Pharmazie, 2006, v. 61(5), p. 375-386.
352. Valenzano D. // Photochem. Photobiol., 1987, v. 46, p. 146-160.
353. Vallee B.L. and Riordan J.F. // Annu. Rev. Biochem., 1969, v. 38, p. 733-794.
354. van der Valk P. et al. // Ann. Oncol., 1990, v. 1, p. 56-64.
355. van Kalken C.K. et al. // Ann. Oncol., 1991, v. 2, p. 55-62.
356. Vasey P.A. et al. // Clin. Cancer Res., 1999, v. 5(1), p. 83-94.
357. Velikyan I. et al. // J. Nucl. Med., 2005, v. 46(11), p. 1881-1888.
358. Verelle P. et al. // JNCI, 1991, v. 83, p. 111-116.
359. Versantvoort C.H.M. et al. // Cancer Res., 1992, v. 52, p. 17-23.
360. Versantvoort C.H.M. et al. // Br. J. Cancer., 1993, v. 68, p. 939-946.
361. Vicent M.J. and Duncan R. // Trends in Biotechnol., 2006, v. 24(1), p. 39-47.
362. Villanueva F.S. et al. // Circulation, 1998, v. 98(1), p. 1-5.
363. Vitetta E.S. et al. // Cancer Res., 1991, v. 51, p. 4052-4058.
364. Wahl A.F. et al. // Int. J. Cancer, 2001, v. 93, p. 590-600.
365. Wang J. et al. // J. Drug Target., 2005, v. 13, p. 73-80.
366. Wang Y.-S. et al. // Adv. Drug Del. Rev., 2002, v. 54(4), p. 547-570.
367. Weber F.W. et al. // In: Westphal M., Tonn J.C., Ram Z., eds. Local Therapies for Glioma: Present Status and Future Developments // Vienna, Austria: Springer-Verlag Wien, 2003, p. 93-103.
368. White S.C. et al. // Br. J. Cancer, 2006, v. 95(7), p. 822-828.
369. Wilson J.M. et al. // J. Biol. Chem., 1992, v. 267, p. 963-967.
370. Winkler U. et al. // Ann. Oncol., 1997, v. 8, p. 139-146.
371. Wong R.S. and Brechbiel M.W. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 2006, v. 66(2), p. S96-99.
372. Wooda E.R. et al. // PNAS, 2008, v. 105(8), p. 2773-2778.
373. Wu C.H. and Wu G.Y. // Adv. Drug Delivery Rev., 1998, v. 29(3), p. 243-248.
374. Wu C.H. and Wu G.Y. // Gastroenterology, 1998, v. 114(6), p. 1304-12.
375. Wu C.H. et al. // J. Biol. Chem., 1989, v. 264, p. 16985-16987.
376. Wu G.Y. and Wu C.H. // J Biol. Chem., 1988, v. 263, p. 14621-14624.
377. Wu W. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2005, v. 44(39), p. 6358-6362.
378. Xia C.Q. et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther., 2000, v. 295(2), p. 594-600.
379. Xie M. et al. // Anticancer Drugs, 2007, v. 18(4), p. 459-466.
380. Yaghini E. et al. // Nanomed., 2009, v. 4(3), p. 353-363.
381. Yang L. and Li Y. // Analyst, 2006, v. 131(3), p. 394-401.
382. Yeh S.S. and Schuster M.W. // Int. J. Nanomedicine, 2006, v. 1(4), p. 411-416.
383. Yu L.X. et al. // J. Pharm. Sci., 1996, v. 85(4), p. 396-401.
384. Yuan P. et al. // J. Hazard Mater., 2009, v. 166(2-3), p. 821-829.
385. Zalatnai A. and Bocsi J. // In Vivo, 2006, v. 20(4), p. 549-552.
386. Zarif L. and Mannino R. J. // In N. Habib (ed.), Cancer gene therapy: past achievements and future challenges, Plenum Publishing Co., London, England, 2000, p. 83-94.
387. Zarif L. // Methods Enzymol., 2005, v. 391, p. 314-329.
388. Zarski J.P. et al. // J. Hepatol., 2001, v. 34(3), p. 486-488.

389. Zhang Z.M. et al. // Chin. Med. J. (Engl), 2007, v. 120(15), p. 1336-1342.
390. Zhao Q. et al. // Bioconjug. Chem., 1997, v. 8(6), p. 927-934.
391. Zheng L.S. et al. // PLoS One, 2009, v. 4(4), p. e5172.
392. Zhu R.R. et al. // Nanotechnology, 2009, v. 20(5), p. 55702.
393. Zijlstra J.G. et al. // Cancer Res., 1987, v. 47, p. 1780-1784.
394. Zwick E. et al. // Trends Mol. Med., 2002, v. 8, p. 17–23.
395. Аль-Названи Н. и др. // Вопр. биол. мед. фарм. химии, 2004, №3, с. 6-10.
396. Дигтярь А.В. и др. // Вестник НИИ молекулярной медицины, 2005, №5, с. 51-61.
397. Дигтярь А.В. и др. // Материалы конференции «Приоритеты фармацевтической науки и практики», 2006, с. 58-60.
398. Киселёв С.М. и др. // Материалы II Международной конференции «Молекулярная Медицина и Биобезопасность», Москва, 2005, с. 155.
399. Луценко Е.В. и др. // Вопр. биол. мед. фарм. химии, 2006, №3, с. 21-27.
400. Луценко С.В. и др. // Материалы XII Российского национального конгресса «Человек и Лекарство», Москва, 2005, с. 678.
401. Луценко С.В. и др. // Вопр. биол. мед. фарм. химии, 1998, №1, с. 34-37.
402. Петров Р.В. и др. // Новости науки и техники, серия “Медицина”, 1999, с. 10-11.
403. Райхер Ю.Л. и др. // Физика твердого тела, 2010, т. 52, с. 277-284.
404. Сергеева Н.С. и др. // Российский онкологический журнал, 1996, № 3, с. 51-55.
405. Столяр С.В. и др. // Материалы 10-го Международного симпозиума «Порядок, беспорядок и свойства оксидов», Ростов-на-Дону, 2007, с. 108-110.
406. Фельдман Н.Б. и др. // Мол. медицина, 2006, №4, с. 33-37.
407. Фельдман Н.Б. и др. // Вестник НИИ молекулярной медицины, 2002, №2, с. 38–54.