

*На правах рукописи*

**Фельдман Наталия Борисовна**

**РАЗРАБОТКА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ  
НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДНЫХ  
ВЕКТОРОВ И АНТИАНГИОГЕННЫХ АГЕНТОВ**

Специальность 03.00.04. – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

**МОСКВА**

2007

Работа выполнена в Государственном учреждении здравоохранения  
Московском научно-исследовательском институте медицинской экологии  
Департамента здравоохранения г. Москвы

**Научный консультант:** доктор биологических наук, профессор  
**Луценко Сергей Викторович**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
**Берман Альберт Ефимович**  
доктор биологических наук  
**Никитина Зоя Кимовна**  
доктор биологических наук  
**Глухов Александр Иванович**

**Ведущая организация:** Институт биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита состоится « 26 » апреля 2007 г. в 14 часов на заседании  
Диссертационного Совета Д 001.010.01 при ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н.  
Ореховича РАМН по адресу: 119121, Москва, Погодинская ул., д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ Биомедицинской химии  
им. В.Н. Ореховича РАМН по адресу: 119121, Москва, Погодинская ул., д. 10.

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2007 г.

**Учёный секретарь Диссертационного Совета**  
кандидат биологических наук

**В.С. Былинкина**

### Актуальность проблемы.

В настоящее время фундаментальной проблемой практической онкологии является высокая токсичность и низкая избирательность действия противоопухолевых препаратов известных классов. Применение систем направленного транспорта с использованием моноклональных антител в качестве векторов не оправдало надежд на их высокую терапевтическую активность. Одним из наиболее перспективных путей решения данной проблемы, а также повышения эффективности действия цитотоксических противоопухолевых химиопрепаратов, является разработка способов их направленной доставки в раковую клетку в составе конъюгатов с векторными полипептидами. Избирательность транспорта при этом достигается за счет способности лиганда (вектора) к высокоаффинному связыванию со специфическими рецепторами, экспрессированными только/или преимущественно на клетках-мишенях. Для практического применения подобные векторы должны отвечать ряду требований, к числу которых относятся доступность в препаративных количествах, стабильность, сохранение высокого сродства к рецептору после химической модификации. В полной мере этим требованиям отвечают эпидермальный фактор роста (ЭФР), аномально высокий уровень экспрессии рецепторов которого отмечается в клетках опухолей эпителиального происхождения, и онкофетальный белок альфа-фетопротеин (АФП), рецепторы которого экспрессируются практически всеми типами раковых клеток, но отсутствуют на клетках нормальных тканей. Поэтому ЭФР и АФП были использованы нами для создания систем направленного действия, предполагающих наличие специфического рецептора и ковалентно связанных векторного белка и модулятора клеточной активности. Подобные системы могут найти применение в различных областях медицины для изучения возможностей направленного влияния на физиологические процессы и повышения эффективности действия известных химиотерапевтических средств при лечении целого ряда заболеваний, включая онкологические. Сравнительное исследование в модельных экспериментах *in vitro* и *in vivo* уровня противоопухолевой активности полученных систем направленного действия позволяет оценить возможности их применения в области практической онкологии. Изучение динамики накопления и внутриклеточного распределения химиопрепаратов, доставляемых в клетку в составе систем направленного действия, имеет существенное теоретическое и прикладное значение, поскольку позволяет прояснить механизм их цитотоксического действия и наметить пути повышения его эффективности.

В последние десятилетия значительным достижением в области поиска новых эффективных методов терапии злокачественных новообразований явилось доказательство необходимости процесса ангиогенеза для роста злокачественных солидных опухолей и создание концепции противоопухолевой терапии, основанной на подавлении ангиогенеза. Ангиогенез – процесс роста капилляров из кровеносных сосудов, в результате которого образуются новые сосудистые сети. При этом патологический рост новых сосудов обуславливает прогрессию ряда заболеваний, прежде всего рост и метастазирование злокачественных опухолей. Подавление

ангиогенеза ведёт к торможению опухолевого роста и развития метастазов. Среди известных в настоящее время эндогенных ингибиторов ангиогенеза наиболее перспективными являются белки ангиостатин и эндостатин. Однако эти полипептидные ингибиторы ангиогенеза проявляют высокую терапевтическую эффективность преимущественно в высоких дозах (25–100 мг/кг массы тела) и требуют продолжительного курса лечения. В связи с этим особенно актуальной задачей представляется разработка высокотехнологичных методов получения ангиостатина и эндостатина, а также поиск возможностей изменения существующих схем терапии этими полипептидами, в частности, путём применения их липосомных форм.

Следует отметить, что несмотря на значительные успехи, достигнутые в последние годы при становлении и развитии антиангиогенной терапии, для полной ремиссии применение только антиангиогенных препаратов часто является недостаточным. Более эффективным подходом представляется комбинированная противоопухолевая химиотерапия, сочетающая в себе препараты с различными механизмами действия. Терапия антиангиогенными полипептидами, разрушающая инфильтрирующие опухоль кровеносные сосуды и уничтожающая раковую клетку опосредованно, могла бы успешно сочетаться с применением высокоэффективных противоопухолевых препаратов, проявляющих в малигнизированных тканях прямое цитотоксическое действие. Очевидно, что комбинированная терапия антиангиогенными агентами и препаратами направленного действия является наиболее перспективным избирательным и эффективным путём воздействия на злокачественные опухоли.

Исходя из этого, актуальной **целью данного исследования** являлось создание и изучение терапевтического потенциала антиангиогенных полипептидов и препаратов направленного действия в схемах комбинированной противоопухолевой терапии.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие **задачи**:

- получить векторные пептиды, способные к избирательному проникновению в клетки злокачественных опухолей путём рецепторопосредованного эндоцитоза;
- осуществить синтез цитотоксических препаратов направленного действия, включающих противоопухолевые химиопрепараты (фталоцианины, хлорины, антрациклиновые антибиотики и растительные алкалоиды) и векторные белки (эпидермальный фактор роста и альфа-фетопротеин человека, а также их рецепторсвязывающие фрагменты);
- исследовать свойства, динамику поступления и внутриклеточного распределения полученных препаратов направленного действия и их противоопухолевую активность в системах *in vitro* и *in vivo*;
- разработать технологичный метод получения рекомбинантного эндостатина человека;
- получить липосомные формы эндостатина и ангиостатина человека и изучить их противоопухолевую терапевтическую эффективность *in vivo* в сравнении с нелипосомными формами;

- исследовать *in vivo* терапевтическую эффективность сочетанного применения антиангиогенных полипептидов и цитотоксических препаратов направленного действия.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

- Терапевтическая активность фталоцианинов, антрациклиновых антибиотиков и растительных алкалоидов может быть значительно увеличена за счет их избирательного рецепторопосредованного транспорта в опухолевые клетки в составе препаратов направленного действия на основе АФП и ЭФР.
- Лекарственная резистентность опухолевых клеток к антрациклиновым антибиотикам может быть существенно снижена при их применении в составе препаратов направленного действия.
- Пептидные фрагменты ЭФР, ТФР $\alpha$  и АФП могут быть использованы в качестве эффективных векторов для направленной доставки химиопрепаратов к опухолевым клеткам-мишеням.
- Рецепторопосредованный эндоцитоз является эффективным механизмом избирательной доставки и транспорта в клетку цитотоксических веществ в составе препаратов направленного действия на основе пептидных векторов.
- Сконструированные плазмидные векторы, несущие ген эндостатина человека, позволяют осуществлять эффективную экспрессию целевого белка в клетках штамма-продуцента. Разработанные методы выделения и ренатурации рекомбинантного эндостатина позволяют получать биологически активный белок в препаративных количествах.
- Сочетанное применение антиангиогенных агентов, способных разрушать опухолевую кровеносную сеть, и препаратов направленного действия, оказывающих прямое цитотоксическое воздействие на раковые клетки, позволяет существенно повысить эффективность противоопухолевой терапии.

### **Научная новизна работы.**

Разработаны оптимальные схемы получения эффективных противоопухолевых препаратов направленного действия, включающих фталоцианины, антрациклиновые антибиотики, растительные алкалоиды и векторные белки (эпидермальный фактор роста и альфа-фетопротеин человека). Убедительно продемонстрировано, что терапевтическая активность исследуемых препаратов может быть значительно увеличена за счет их избирательного рецепторопосредованного транспорта в опухолевые клетки в составе конъюгатов с векторными полипептидами.

Продемонстрирована возможность значительного снижения лекарственной устойчивости опухолевых клеток к антрациклиновым антибиотикам при использовании препаратов направленного действия. Впервые исследована динамика накопления и внутриклеточное распределение антибиотика антрациклинового ряда доксорубина, доставляемого в опухолевые клетки в составе препарата направленного

действия, включающего эпидермальный фактор роста в качестве вектора. Полученные данные проливают свет на механизм цитотоксического действия полученных препаратов направленного действия и позволяют наметить пути увеличения их противоопухолевой активности.

Впервые получены синтетические пептиды ЭФР<sub>МФ</sub> и ТФР<sub>МФ</sub>, представляющие собой модифицированные рецепторсвязывающие фрагменты соответственно эпидермального фактора роста (ЭФР) и трансформирующего фактора роста  $\alpha$  (ТФР $\alpha$ ) человека. Показана способность этих пептидов проникать в раковые клетки путём рецепторопосредованного эндоцитоза.

Впервые получены ковалентные конъюгаты пептидов ЭФР<sub>МФ</sub>, ТФР<sub>МФ</sub> и рекомбинантного белка – 3-го домена  $\alpha$ -фетопротейна человека (АФП<sub>3Д</sub>) с доксорубицином и продемонстрирована их высокая специфическая цитотоксическая и противоопухолевая активность *in vitro* и *in vivo*.

Сконструированы плазмидные векторы *E. coli*, позволяющие эффективно осуществлять индуцированный биосинтез рекомбинантного эндостатина человека в клетках штамма-продуцента. Разработан простой и эффективный метод выделения и ренатурации рекомбинантного эндостатина, позволяющий получать биологически активный белок.

Впервые получены липосомные формы ангиостатина и эндостатина человека и продемонстрировано, что противоопухолевая эффективность данных форм *in vivo* выше, чем соответствующих нелипосомных форм.

Впервые *in vivo* продемонстрирована более высокая терапевтическая эффективность комбинированного применения антиангиогенных полипептидов и цитотоксических препаратов направленного действия по сравнению с монотерапией каждым из данных терапевтических агентов.

### **Практическая значимость исследования.**

Разработанные противоопухолевые препараты направленного действия, наряду с оптимизированными методами их получения и тестирования, могут быть использованы для дальнейших исследований в области практической онкологии с перспективой перехода в разряд препаратов, проходящих доклинические испытания.

Применение рецепторсвязывающих фрагментов ЭФР, ТФР $\alpha$  и АФП в качестве молекулярных векторов позволяет, наряду с увеличением стабильности и эффективности действия, достичь значительного снижения стоимости препаратов направленного действия.

Полученные штаммы-продуценты эндостатина человека и разработанные методы очистки и ренатурации этого белка могут быть использованы в области промышленной биотехнологии, а полученный рекомбинантный белок – как для научно-исследовательских работ, так и для его применения в области практической медицины.

Обнаружение более высокого терапевтического потенциала *in vivo* липосомных форм ангиостатина и эндостатина по сравнению с их свободными формами делает

возможным развитие этого направления в области создания новых противоопухолевых средств.

Продemonстрированное преимущество комбинированной терапии опухолей с применением двух классов препаратов с различными механизмами противоопухолевого действия, таких как антиангиогенные полипептиды и цитотоксические препараты направленного действия, представляет большой интерес при поиске эффективных схем противоопухолевой терапии. Полученные результаты расширяют понимание вопроса сочетания разных типов антинеопластических средств при выборе схем лечения онкологических заболеваний и показывают важность продолжения исследований антиангиогенных полипептидов и цитотоксических химиопрепаратов на основе пептидных векторов, специфические рецепторы которых гиперэкспонированы на мембранах злокачественно перерождённых клеток.

На основе разработанных технологий получения рекомбинантного эндостатина человека, препаратов направленного действия, включающих цитотоксические агенты и векторные полипептиды, а также липосомных форм антиангиогенных агентов оформлено 6 патентов на изобретение.

**Апробация диссертационной работы.** Результаты исследований доложены на конференциях: Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine (ISOBM) (1996, 1999, 2000, 2001, 2002, 2004); 5<sup>th</sup> European Winter Oncology Conference, France, 1997; the European Cancer Conference ECCO 9, Hamburg, 1997; International Conferences New Anticancer Agents, Athens, 1997; VIII конференции «Новые направления биотехнологии» РАН, Москва, 1997; Meeting of the EACR (1998, 2002, 2004, 2006); 4<sup>th</sup> European Congress of Pharmaceutical Sciences, Milan, 1998; Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (2000, 2003, 2004, 2005); 17<sup>th</sup> Meeting of the International Academy of Tumour Marker Oncology, Hong Kong, 2000; 3<sup>rd</sup> Central European Conference on Human Tumor Markers, Karlovy Vary, 2001; 3<sup>rd</sup> international symposium on genetic anticancer agents, Amsterdam, 2002; 14<sup>th</sup> International Congress on Anti-Cancer Treatment, Paris, 2003; 37<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of European Society for Clinical Investigation (ESCI), Verona, 2003; 9th World Congress on Cancers of the Skin, Sevilla, 2003; Объединенном иммунологическом форуме, Екатеринбург, 2004; международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», Москва (2004, 2005); the World Conference on Dosing of Antiinfectives, Nurnberg, Germany, 2004; международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», Пушкино, 2005.

**Публикации:** основные материалы работы изложены в 35 статьях, 48 материалах научных конференций, 6 оформленных патентах РФ на изобретение.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 248 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы,

описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, общие выводы и указатель цитируемой литературы (330 источников). Работа иллюстрирована 67 рисунками и 23 таблицами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Объекты и методы исследования**

Для реализации поставленных задач были использованы методы исследования:

- химические (синтез, выделение и очистка препаратов направленного действия, твердофазный химический синтез);
- физико-химические (флуориметрия, проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия, центрифугирование, электрофорез, хроматография);
- биологические (исследование биологической активности препаратов на культурах клеток, исследование противоопухолевой активности на моделях экспериментальных опухолей у животных).

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Задачей первого этапа исследований являлось определение возможностей реализации подхода, рассматривающего рецепторопосредованный эндоцитоз в качестве универсального механизма, позволяющего доставлять в клетку-мишень различные эффекторы с помощью физиологических лигандов и, таким образом, оказывать целенаправленное влияние на внутриклеточные процессы. Для практического выполнения поставленной задачи в качестве модели нами были использованы опухолевые клетки человека и химиопрепараты, широко исследуемые и применяемые в области практической онкологии. В качестве физиологических лигандов были использованы белки ЭФР и АФП, а также их рецепторсвязывающие фрагменты, наиболее полно отвечающие критериям, предъявляемым к векторным молекулам (стабильность, доступность, высокий уровень рецепторов на клетках-мишенях и др.). Выбор области исследования продиктован большим практическим значением химиотерапии злокачественных новообразований и повышения ее эффективности в медицине.

#### **Получение и исследование цитотоксической и противоопухолевой активности препаратов направленного действия на основе АФП и ЭФР *in vitro* и *in vivo***

Для исследования возможностей повышения противоопухолевой терапевтической активности фталоцианинов алюминия (ФЦ(Al)) и кобальта (ФЦ(Co)), антрациклиновых антибиотиков доксорубина (ДР) и карминомицина (КМ) и растительных алкалоидов винкристина (ВК) и винбластина (ВБ), доставляемых в опухолевые клетки в результате рецепторопосредованного эндоцитоза, были



синтезированы их конъюгаты с векторными белками. Конъюгаты ДР, КМ и ВБ с АФП и ЭФР были получены с помощью водорастворимого карбодиимида, конъюгаты ФЦ(А1), ФЦ(С<sub>0</sub>) и ВК с АФП и ЭФР – путем прямого присоединения цитотоксических препаратов к белку. Молярные соотношения векторный белок : химиопрепарат в конъюгатах АФП и ЭФР составляли 1:4 и 1:1 соответственно. Относительно высокое содержание цитотоксических препаратов в препаратах на основе АФП обусловлено более высокой молекулярной массой белка (~70 кДа) по сравнению с ЭФР (6,045 кДа). Увеличение содержания химиопрепарата в препаратах на основе ЭФР может привести к уменьшению аффинности векторной молекулы к рецептору и сказаться на эффективности внутриклеточной интернализации.

### **Цитотоксическая активность препаратов направленного действия на основе АФП и ЭФР**

Сравнительное исследование цитотоксической активности (ЦТА) свободных противоопухолевых препаратов и их конъюгатов с АФП проводили на клетках Т-клеточной лимфомы человека линии QOS, обладающих способностью к эффективному связыванию и внутриклеточному накоплению данного белка [Severin 1995]. Опухолевые клетки рака молочной железы человека линии MCF-7 и меланомы мыши линии В16, несущие на поверхности рецепторы ЭФР, использовали в качестве моделей для оценки ЦТА соответствующих препаратов. Результаты исследования ЦТА свободных и входящих в состав препаратов направленного действия на основе АФП и ЭФР противоопухолевых агентов приведены в табл. 1 и 2, соответственно.

**Таблица 1. Цитотоксическая активность химиотерапевтических препаратов и их конъюгатов с АФП в отношении клеток Т-клеточной лимфомы человека линии QOS (приведены средние значения IC<sub>50</sub> по трем экспериментам для каждого типа клеток).**

<b>Препарат</b>	<b>IC<sub>50</sub>, мкМ</b>	<b>ПСД*</b>
<b><u>Фталоцианины</u></b>		
ФЦ(А1)	1,46	1,34
АФП–ФЦ(А1)	1,09	
ФЦ(С <sub>0</sub> )	12,2	
АФП–ФЦ(С <sub>0</sub> )	2,4	
<b><u>Антрациклиновые антибиотики</u></b>		
ДР	0,68	2,34
АФП–ДР	0,29	
КМ	1,25	
АФП–КМ	0,96	
<b><u>Растительные алкалоиды</u></b>		
ВБ	0,022	8,8
АФП–ВБ	0,0025	

\* Показатель соотношения доз (ПСД) представляет собой отношение значений IC<sub>50</sub> в присутствии свободного цитотоксического препарата и препарата направленного действия.

**Таблица 2. Цитотоксическая активность химиотерапевтических препаратов и их конъюгатов с ЭФР в отношении опухолевых клеток карциномы молочной железы человека линии MCF-7 и меланомы мыши линии В16 (приведены средние значения IC<sub>50</sub> по трем экспериментам для каждого типа клеток).**

Препарат	MCF-7		В16	
	IC <sub>50</sub> , мкМ	ПСД*	IC <sub>50</sub> , мкМ	ПСД*
<b><u>Фталоцианины</u></b>				
ФЦ(Al)	2,5		6,1	
ЭФР-ФЦ(Al)	0,9	2,78	2,5	2,44
ФЦ(Сo)	40		16,2	
ЭФР-ФЦ(Сo)	0,3	133,33	12,1	1,34
<b><u>Антрациклиновые антибиотики</u></b>				
ДР	0,65		0,42	
ЭФР-ДР	0,57	1,14	0,18	2,33
КМ	0,029		0,028	
ЭФР-КМ	0,007	4,14	0,027	1,04
<b><u>Растительные алкалоиды</u></b>				
ВБ	0,0071		0,034	
ЭФР-ВБ	0,0017	4,18	0,00015	226,67
ВК	0,0084		0,011	
ЭФР-ВК	0,002	4,20	0,0022	5,0

\* Показатель соотношения доз (ПСД) представляет собой отношение значений IC<sub>50</sub> в присутствии свободного цитотоксического препарата и препарата направленного действия.

### ***ЦТА препаратов, включающих фталоцианины***

Следует отметить, что механизм активации фталоцианинов, используемых для фотодинамической (ФЦ(Al)) и каталитической, или темновой (ФЦ(Сo)) терапии может быть различным. Для активации ФЦ(Al) облучали клетки светом соответствующей длины волны [Moan 1990]. ФЦ(Сo) активировали добавлением в клеточную среду аскорбиновой кислоты без использования источника света [Moan 1990, Van Hillegersberg 1994]. Мольное соотношение ФЦ(Сo):аскорбиновая кислота составляло 1:10. Изучение ЦТА фталоцианинов и включающих их препаратов на основе АФП показало, что активность препаратов направленного действия заметно превышала активность свободных ФЦ, причем наибольшую ЦТА проявлял препарат АФП-ФЦ(Сo). Аналогичные результаты получены для препаратов на основе ЭФР, причем препарат, включающий ФЦ(Сo), проявлял чрезвычайно высокую ЦТА в отношении клеток карциномы молочной железы линии MCF-7 (табл. 2). Наибольшая эффективность цитотоксического действия препаратов на основе ЭФР отмечалась также в отношении клеток MCF-7. Представленные данные наглядно иллюстрируют преимущество векторной доставки фталоцианинов в клетку, позволяющей увеличить цитотоксичность исследуемых препаратов.

### ЦТА препаратов, включающих антрациклиновые антибиотики

Как видно из табл. 1 и 2, ЦТА препарата АФП–ДР в отношении клеток Т-клеточной лимфомы линии QOS превышала активность свободного вещества более чем в 2 раза. ЦТА препарата ЭФР–ДР и свободного антибиотика в отношении клеток линии MCF-7 характеризовались близкими значениями; в то же время препарат ЭФР–ДР в отношении клеток мышинной меланомы линии B16 проявлял ЦТА в 2 раза большую, чем свободный ДР. Из препаратов, включающих КМ, лишь ЭФР–КМ проявлял ЦТА, существенно превышающую активность свободного антибиотика, в экспериментах с клетками линии MCF-7 (табл. 1, 2).

Дополнительное сравнительное исследование ЦТА ДР, КМ и препаратов направленного действия проводили на чувствительных к этим антибиотикам клетках карциномы яичника человека линии SKOV3, поскольку оба вектора эффективно доставляют цитотоксические препараты в клетки данной линии [Severin 1995]. Результаты исследования приведены на рис. 1 и 2 и в табл. 3.

Как видно на рис. 1 и 2, АФП–ДР оказался более эффективным цитотоксическим препаратом (ЦТА препарата АФП–ДР выше активности ДР в 4,14 раза), чем АФП–КМ ( $IC_{50}$  конъюгата и свободного вещества характеризуются близкими значениями), что может быть обусловлено различиями в чувствительности и механизмах устойчивости клеток к данным антибиотикам. Препараты ЭФР–ДР, напротив, является менее цитотоксичным, чем ЭФР–КМ:  $IC_{50}$  свободного ДР и его конъюгата с ЭФР оказались равными, в то время как активность препарата ЭФР–КМ превышала активность свободного КМ в 3,67 раза.

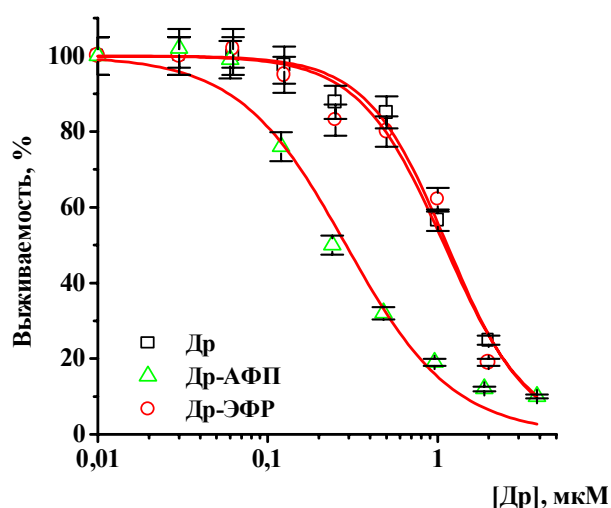


Рис. 1. Выживаемость клеток карциномы яичника человека линии SKOV3 при инкубации со свободным ДР и препаратами АФП–ДР и ЭФР–ДР в течение 72 ч.

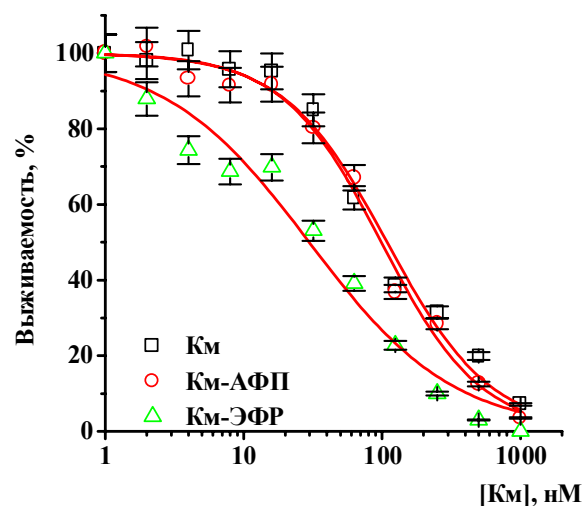


Рис. 2. Выживаемость клеток карциномы яичника человека линии SKOV3 при инкубации со свободным КМ и препаратами АФП–КМ и ЭФР–КМ в течение 72 ч.

**Таблица 3. Цитотоксическая активность доксорубина и карминомина и их конъюгатов с АФП и ЭФР в отношении клеток карциномы яичника человека линии SKOV3 (приведены средние значения IC<sub>50</sub> по трем экспериментам).**

Препарат	IC <sub>50</sub> , нМ	ПСД*
ДР	1200	
АФП–ДР	290	4,14
ЭФР–ДР	1200	1
КМ	110	
АФП–КМ	99	1,11
ЭФР–КМ	30	3,67

\* Показатель соотношения доз (ПСД) представляет собой отношение значений IC<sub>50</sub> в присутствии свободного антибиотика и препарата направленного действия.

Представленные данные свидетельствуют о том, что эффективность цитотоксического действия препаратов направленного действия определяется не только природой цитотоксических агентов и векторных молекул и способом их химической “сшивки”, но и правильным выбором наиболее уязвимых к действию препаратов опухолевых клеток-мишеней.

#### ***ЦТА препаратов, включающих растительные алкалоиды***

ЦТА всех препаратов на основе ВБ и ВК, представленных в табл. 1 и 2, превышала активность свободных алкалоидов в отношении клеток исследуемых линий как минимум в 4 раза. При этом превышение активности препаратов на основе ЭФР в отношении клеток линии MCF-7 над активностью свободных ВБ и ВК находилось примерно на одинаковом уровне (в 4,18 и 4,2 раза соответственно). ЦТА препарата АФП–ВБ в отношении клеток линии QOS превосходила активность свободного ВБ почти в 9 раз. Наибольшей эффективностью цитотоксического действия отличался препарат ЭФР–ВБ, ЦТА которого в отношении клеток линии V16 превышала активность свободного ВБ более чем в 266 раз.

Представленные результаты исследования векторных возможностей ЭФР и АФП наглядно демонстрируют, что оба белка могут быть успешно использованы при создании препаратов направленного действия. При применении подобных препаратов, поступающих в клетки в процессе рецепторопосредованного эндоцитоза, их ЦТА в большинстве случаев значительно превышает активность свободных химиопрепаратов, попадающих в клетку в результате диффузии. В зависимости от механизма действия препарата, адресно доставляемого в клетку с помощью векторов, могут быть целенаправленно вызваны эффекты, модулирующие клеточную активность. Таким образом, подход к химиотерапии, предусматривающий использование рецепторопосредованного эндоцитоза для транспорта в клетку-мишень препаратов направленного действия, включающих физиологический лиганд и химиопрепарат, представляется чрезвычайно перспективным.

## Исследование противоопухолевой активности фталоцианинов, антрациклиновых антибиотиков, растительных алкалоидов и включающих их препаратов направленного действия *in vivo*

Сравнительное исследование противоопухолевой активности свободных и входящих в состав конъюгатов цитотоксических препаратов проводили на моделях перевиваемых солидных опухолей мышей с использованием клеток мышинового лейкоза линии P388 (мыши DBA/2) и мышинной меланомы B16 (мыши C57Bl/6). Нами были использованы разные модели опухолей для изучения векторных возможностей исследуемых белков, поскольку ранее было показано, что АФП эффективно доставляет химиопрепараты в клетки линии P388 [Severin 1996], а ЭФР в клетки линии B16 [Луценко 1998]. Препараты вводились 1 раз в 4 дня, всего 3 инъекции, начиная со 2 дня после прививки опухоли, в дозах (по химиопрепарату) 0,2 мг/кг в случае ФЦ(Со), ВБ и ВК, и 0,14 мг/кг в случае ДР и КМ. Через 1 ч после каждого введения препаратов ФЦ(Со) животные получали внутримышечно аскорбиновую кислоту в дозе 0,46 мг/кг. Эффективность противоопухолевого действия исследуемых препаратов оценивали по способности к ингибированию роста опухолей и увеличению средней продолжительности жизни животных, подвергавшихся терапии, по сравнению с контролем. Результаты исследований приведены в табл. 4 и 5.

**Таблица 4. Противоопухолевая активность свободных и входящих в состав препаратов направленного действия химиотерапевтических агентов в отношении солидных опухолей мышинового лейкоза линии P388**

Препарат	ОРО*, % от контроля	СПЖ, дни	УСПЖ, %
контроль	100	18,5±0,3	0
ФЦ(Со)	103	19,1±1,1	3,2
АФП–ФЦ(Со)	70	26,5±0,2	43,2
контроль	100	27,7±0,3	0
ДР	37,3	32,6±1,5	17,6
АФП–ДР	12,4	42,2±16,3	59,6
контроль	100	20,5±0,3	0
КМ	81,2	21,7±0,4	5,9
АФП–КМ	53,4	25,7±1,5	25,4
контроль	100	7,0±1,5	0
ВБ	32	9,7±1,5	38,6
АФП–ВБ	9	13,2±1,6	88,6

\* Данные на день начала гибели животных в контрольной группе.

### **Противоопухолевая активность препаратов, включающих ФЦ(Со)**

Несмотря на то, что препараты как ФЦ(Al), так и ФЦ(Со) обладали высокой цитотоксической активностью, для экспериментов *in vivo* мы избрали ФЦ(Со), поскольку данный препарат, в отличие от ФЦ(Al), может быть активирован при введении в клеточную среду и в органы аскорбиновой кислоты в отсутствие источника света [Novodarova 1996]. Как видно из табл. 4, терапевтическое применение свободного

ФЦ(Со) в указанных дозах не приводило к ингибированию роста опухолей, в то время как лечение животных препаратом АФП–ФЦ(Со) приводило к значительному замедлению роста опухолей. При этом величина ингибирования роста опухолей составляла 30% на день начала гибели контроля. При применении ФЦ(Со) и ЭФР–ФЦ(Со) по такой же схеме ингибирование роста опухолей отмечалось только в случае препарата направленного действия и составляло 44% к дню начала гибели контрольных животных, что свидетельствует о высокой противоопухолевой эффективности препарата ЭФР–ФЦ(Со) (табл. 5).

**Таблица 5. Противоопухолевая активность свободных и входящих в состав препаратов направленного действия химиотерапевтических агентов в отношении солидных опухолей мышины меланомы линии В16.**

Препарат	ОРО*, % от контроля	СПЖ, дни	УСПЖ, %
контроль	100	35,6±1,0	0
ФЦ(Со)	113	36,2±2,5	1,7
ЭФР–ФЦ(Со)	56	45,9±2,9	28,9
контроль	100	35,9±0,7	0
ДР	58,5	32,6±1,5	-9,0
ЭФР–ДР	29,8	42,8±2,1	20,2
контроль	100	30,9±4,8	0
КМ	88,9	32,5±7,1	5,2
ЭФР–КМ	48,2	39,4±2,1	27,5
контроль	100	36,1±4,0	0
ВБ	77	35,8±2,6	-0,5
ЭФР–ВБ	48	45,4±3,4	27,5
контроль	100	36,1±4,0	0
ВК	49,2	36,6±2,3	1,4
ЭФР–ВК	30,7	47,3±2,9	31,0

\* - на день начала гибели животных в контрольной группе.

Как видно из табл. 4 и 5, лечение животных как препаратом АФП–ФЦ(Со), так и ЭФР–ФЦ(Со) оказывало также значительный позитивный эффект в отношении УСПЖ животных. Представленные данные свидетельствуют о том, что как АФП, так и ЭФР могут быть успешно использованы для направленного транспорта фталоцианинов к опухолевым клеткам-мишеням.

#### **Противоопухолевая активность препаратов, включающих ДР и КМ**

Для изучения возможностей повышения терапевтической активности ДР и КМ исследовали влияние свободных препаратов и их конъюгатов с АФП и ЭФР на развитие опухолей *in vivo*. При лечении животных свободным ДР и препаратом АФП–ДР ингибирование роста опухолей наблюдалось в группах, получавших как свободный антибиотик, так и конъюгат. При этом направленный препарат оказывал более сильное супрессивное действие в отношении опухолей, чем свободный ДР (табл. 4). Так, к 28 дню эксперимента средний размер опухолей в группе, получавшей АФП–ДР, был в 3 раза меньше, чем в группе, получавшей ДР. Наиболее значительное УСПЖ также

наблюдалось в группе животных, получавших АФП-ДР (табл. 5). Таким образом, терапевтическая активность препарата АФП-ДР была значительно выше, чем активность свободного ДР. В группах животных, получавших ДР и препарат ЭФР-ДР, наблюдалось заметное ингибирование опухолевого роста. При этом относительный размер опухолей у животных, получавших ЭФР-ДР, к 40 дню после прививки опухоли оказался в 1,7 раза меньше, чем у животных, получавших свободный ДР, и в 3,4 раза меньше, чем в контроле (табл. 5). Кроме того, в отличие от свободного ДР, внутривенное введение препарата направленного действия приводило к 20% УСПЖ по сравнению с контролем (табл. 5).

Исследование влияния КМ и препарата АФП-КМ на процесс опухолевого роста показало, что КМ обладал менее выраженным ингибирующим действием по сравнению с направленным препаратом. Так, к 22 дню эксперимента средний размер опухолей у животных, получавших АФП-КМ, оказался меньше примерно в 1,5 раза, чем у животных, получавших свободный КМ, и в 1,9 раза меньше, чем в контрольной группе. Терапевтическое применение препарата АФП-КМ, в отличие от свободного КМ, также приводило к заметному УСПЖ животных (табл. 4).

Сравнительное исследование противоопухолевой активности КМ и ЭФР-КМ показало, что свободный антибиотик оказывал слабое ингибирующее действие в отношении роста опухолей в сравнении с контролем, тогда как ингибирующее действие ЭФР-КМ оказалось значительным – относительный размер опухолей в группе, получавшей ЭФР-КМ, составил лишь 48,2% (табл. 5). Эффект препарата ЭФР-КМ в отношении УСПЖ животных также оказался существенно выше эффекта свободного КМ.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что терапевтическая активность ДР и КМ может быть значительно повышена за счет их адресной доставки к опухолевым клеткам-мишеням с помощью АФП и ЭФР. Следует также отметить, что используемые в работе дозы ЭФР, вводимого в составе препаратов направленного действия, не индуцируют ускоренного развития опухолей и, таким образом, митогенная активность ЭФР не является препятствием для его использования в качестве вектора для адресной доставки цитотоксических препаратов к опухолевым клеткам-мишеням.

### ***Противоопухолевая активность препаратов, включающих ВБ и ВК***

Исследование влияния препарата АФП-ВБ на развитие солидных опухолей линии L1210 показало, что как свободное вещество, так и конъюгат в исследуемых дозах оказывали ингибирующее действие на рост опухолей (табл. 4). При этом относительный объем опухолей у животных, получавших АФП-ВБ, к 8 дню эксперимента оказался в 3,6 раза меньше, чем у животных, получавших свободный ВБ, и примерно в 11 раз меньше, чем в контроле. Терапевтическое применение препарата АФП-ВБ приводило к наибольшему УСПЖ животных (88,6%) по сравнению со всеми исследуемыми препаратами на основе АФП и ЭФР (табл. 4).

Исследование влияния ВБ и препарата ЭФР–ВБ в тех же дозах на рост опухолей линии В16 показало, что ЭФР–ВБ обладал более выраженным ингибирующим действием, чем свободный алкалоид (табл. 5). Относительный размер опухолей у животных, получавших ЭФР–ВБ, к 31 дню эксперимента оказался в 1,6 раза меньше, чем у животных, получавших ВБ, и более чем в 2 раза меньше, чем в контроле. При лечении животных препаратом ЭФР–ВБ УСПЖ животных достигало 27%, тогда как свободный ВБ в используемых дозах практически не оказывал влияния на продолжительность жизни животных (табл. 5). Аналогичным противоопухолевым действием обладал препарат ЭФР–ВК. При его применении относительный размер опухолей у животных к 31 дню эксперимента оказался в 1,6 раза меньше, чем у животных, получавших свободный ВК в той же дозе, и более чем в 3 раза меньше, чем у контрольных животных (табл. 5). УСПЖ животных при терапии препаратом направленного действия достигало 31%, тогда как применение свободного ВК практически не влияло на продолжительность жизни животных.

Представленные данные позволяют заключить, что АФП и ЭФР могут быть использованы в качестве векторов для адресной доставки противоопухолевых препаратов к клеткам-мишеням. На основе данных белков могут быть созданы противоопухолевые препараты направленного действия с цитотоксическими веществами различных классов. Противоопухолевая активность препаратов направленного действия на основе векторных белков, включающих фталоцианины, антрациклиновые антибиотики и растительные алкалоиды, значительно превышает активность свободных цитотоксических препаратов. По нашему мнению, применение таких систем для лечения резистентных к химиотерапевтическим препаратам опухолей могло бы значительно повысить эффективность терапии за счет преодоления препаратами направленного действия резистентности опухолевых клеток и снижения терапевтических доз препаратов. Кроме того, многих побочных эффектов, вызываемых химиотерапевтическими препаратами, например высокой кардиотоксичности ДР, можно было бы избежать при применении систем направленного действия за счет адресной доставки цитотоксических препаратов к клеткам-мишеням. Для достижения максимальной терапевтической эффективности разработанных нами препаратов необходимо их дальнейшее совершенствование наряду с подбором наиболее уязвимых к терапии опухолей и поиском оптимальных схем лечебного применения препаратов.

### **Сравнительное исследование ЦТА, динамики накопления и внутриклеточного распределения свободного и входящего в состав препарата направленного действия на основе ЭФР доксорубина**

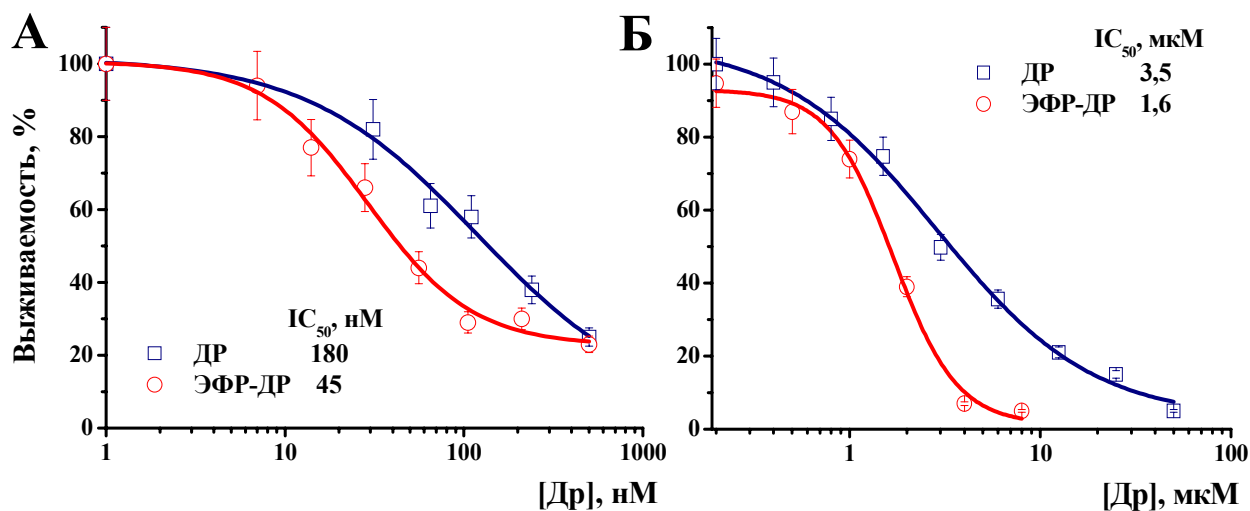
Резистентность, или множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток к действию ДР является основным препятствием на пути успешного его применения для терапии онкологических заболеваний. Конъюгирование ДР с векторным белком может значительно увеличить его цитотоксичность в отношении резистентных клеток, что представляется многообещающим путем преодоления МЛУ.



С точки зрения проявления цитотоксической активности ДР и ее зависимости от резистентности опухолевых клеток важнейшими факторами являются кинетические параметры включения антибиотика в клетку, а также оценка уровня его накопления и внутриклеточной локализации. Интернализация, внутриклеточная транслокация, компартментализация и накопление конъюгата ДР с белком, а также освобождение антибиотика внутри клетки в фармакологически активной форме являются важнейшими параметрами, определяющими ЦТА направленного препарата.

**ЦТА доксорубина и включающего его препарата на основе ЭФР в отношении чувствительной и резистентной к антрациклиновым антибиотикам клеточной линии карциномы молочной железы MCF-7**

Результаты сравнительного исследования ЦТА ДР и препарата ЭФР-ДР в отношении опухолевых клеток, чувствительных (MCF-7/Wt) и резистентных (MCF-7/AdrR) к действию ДР, приведены на рис. 3. Препараты проявляли дозозависимую ЦТА в отношении клеток обеих линий, причем препарат ЭФР-ДР проявлял более высокую активность, чем свободный ДР (в случае клеток линии MCF-7/Wt в 4 раза, а MCF-7/AdrR – примерно в 2,2 раза, что, по-видимому, обусловлено различиями в путях поступления и внутриклеточного распределения препаратов). Наиболее высокая ЦТА препарата ЭФР-ДР проявлялась в отношении чувствительных клеток линии MCF-7/Wt ( $IC_{50}=45$  нМ) (рис. 3 А). В отношении резистентных клеток линии MCF-7/AdrR активность ЭФР-ДР была существенно ниже ( $IC_{50}=1,6$  мМ) (рис. 3 Б), что, очевидно, объясняется действием механизмов, определяющих резистентность.



**Рис. 3. Цитотоксическая активность свободного и входящего в состав препарата направленного действия на основе ЭФР ДР в отношении клеток карциномы молочной железы человека линии MCF-7/Wt (А) и MCF-7/AdrR (Б).**

### ***Накопление свободного и входящего в состав препарата направленного действия ДР в чувствительных и резистентных опухолевых клетках***

В связи с тем, что уровень ЦТА препаратов направленного действия, так же, как и свободных химиопрепаратов, во многом определяется скоростью и характером поступления препаратов в клетку (пассивная диффузия и рецептор-опосредованный эндоцитоз), их компартиментализацией, а также эффективностью действия механизмов клеточной резистентности, мы провели исследование закономерностей поступления, накопления и внутриклеточного распределения химиопрепаратов на примере ДР путем измерения его собственной флуоресценции в клеточных суспензиях. Отсутствие заметного изменения флуоресценции ДР при его взаимодействии с клеточными органеллами и мембранами и, напротив, гашение флуоресценции при интеркаляции антибиотика в ДНК позволяет производить измерение его накопления в ядре и цитоплазме клеток [Tarasiuk 1989]. Приведенные выше факты легли в основу производимых нами исследований.

Перенос ДР в составе препарата направленного действия и в свободном виде в клетки контролировали, используя флуоресцентные свойства этого антибиотика ( $\lambda$  возбуждения 473 нм,  $\lambda$  эмиссии 556 нм). Следует отметить, что концентрация ДР в клеточных суспензиях при проведении эксперимента не должна превышать 6 мМ, поскольку интенсивность флуоресценции возрастает линейно при увеличении концентрации ДР до достижения данной величины, после чего наблюдается гашение флуоресценции за счет стэкинга молекул антибиотика [Tarasiuk 1989]. Клетки инкубировали с препаратом ЭФР–ДР или свободным ДР в течение 2 ч в питательной среде, затем собирали центрифугированием, измеряли флуоресценцию супернатанта, быстро промывали PBS с 0,1% BSA, суспендировали в растворе PBS и измеряли флуоресценцию суспензии клеток, соответствующую количеству ДР в цитоплазме и на мембранах клеток. Затем клетки лизировали, добавляя к суспензии 10% раствор ДСН до его конечной концентрации 0,2%, инкубировали 2 мин при 37 °С и измеряли флуоресценцию лизатов, отражающую общее содержание антибиотика в клетках. Количество антрацилина, интеркалировавшего в ДНК, в ядрах клеток определяли по разности флуоресценции препаратов в присутствии ДСН и без него. Количество распавшегося ДР определяли по разности значений флуоресценции препарата в лизатах в начале инкубации и после ее завершения.

Данные по накоплению ДР в клетках линий MCF-7/Wt и MCF-7/AdrR представлены в табл. 6. Исследование накопления ДР в клетках показало, что после 2 ч инкубации содержание ДР в чувствительных клетках оказалось в 1,95 раза выше, чем в резистентных. Низкое содержание ДР в резистентных клетках обусловлено внутриклеточной деградацией свободного антибиотика, а также действием механизма, обеспечивающего выведение ДР из клетки [Сергеева 1996]. При инкубации клеточной суспензии с ЭФР–ДР уровень накопления ДР в чувствительных и резистентных клетках существенно не различался. Очевидно, что при рецептор-опосредованном

эндоцитозе препарата ЭФР–ДР эффективность действия механизма, определяющего резистентность клеток к ДР, заметно снижена.

**Таблица 6. Содержание ДР в клетках и среде инкубации по отношению к его исходному количеству в среде через 2 ч инкубации клеток MCF-7/Wt и MCF-7/AdrR со свободным и входящим в состав препарата направленного действия антибиотиком.**

Клеточная культура	Препарат	Содержание ДР, %		
		Клетки	Среда	Распад
MCF-7/Wt	ДР	29,7	60,1	10,2
	ЭФР–ДР	40,1	52,4	7,5
MCF-7/AdrR	ДР	15,2	68,5	16,3
	ЭФР–ДР	36,6	55,3	8,1

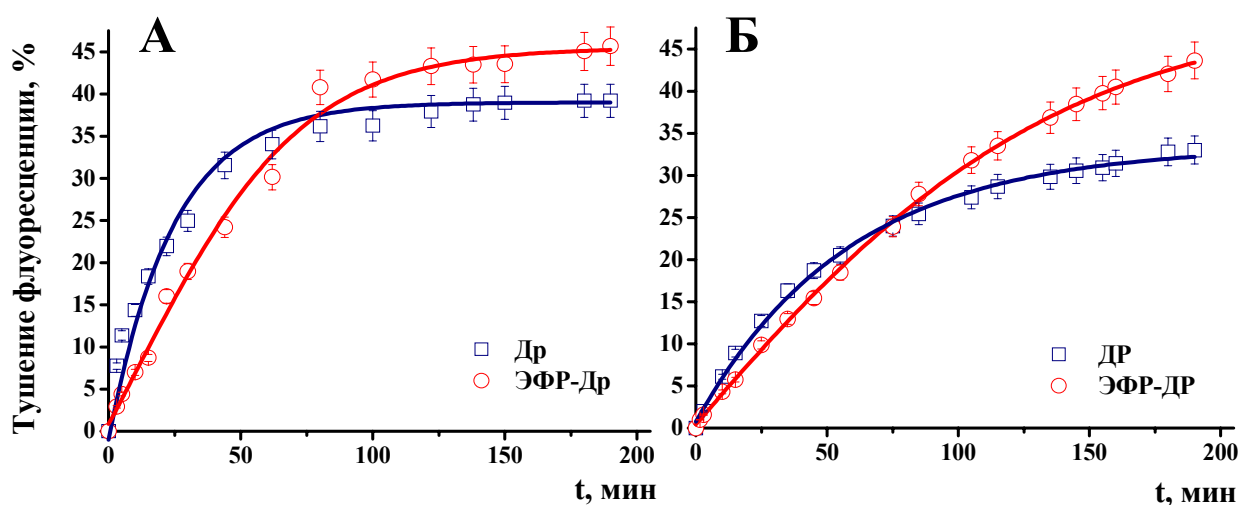
Следует отметить, что уровень накопления ДР как чувствительными, так и резистентными клетками при его поступлении в составе препарата ЭФР–ДР заметно превышает уровень накопления свободного ДР.

Представленные данные свидетельствуют о том, что рецепторопосредованный эндоцитоз, заложенный в основу препаратов направленного действия в качестве механизма транспорта, является более действенным средством доставки ДР в клетки MCF-7, чем диффузия свободного ДР через клеточную мембрану по градиенту концентрации. Высокий уровень накопления химиопрепарата резистентными клетками, обусловленный действием нахождения последнего в составе препарата направленного действия, может служить объяснением заметного снижения клеточной резистентности.

Ранее было показано, что ДР в клетке может подвергаться деградации [Tritton 1991]. Как видно из табл. 6, в процессе инкубации препарата ЭФР–ДР и свободного ДР с клетками линий MCF-7/Wt и MCF-7/AdrR происходит деградация ДР, регистрируемая по снижению флуоресценции, обусловленному образованием нефлуоресцирующих продуктов распада ДР, но не его интеркаляцией в ДНК. Следует отметить, что ДР, доставляемый в клетку в составе препарата направленного действия на основе ЭФР, подвержен распаду в меньшей степени, чем проникающий в клетку посредством свободной диффузии. Более низкий распад ДР может быть объяснен протективным действием полипептида, заключающемся в снижении воздействия на него цитоплазматических и околочелюстных ферментов, например транскламиназы [Tritton 1991]. Наиболее высокий уровень деградации ДР наблюдался при инкубации клеток со свободным ДР, причем в резистентных клетках уровень распада был выше (16,3%), чем в чувствительных (10,2%) (табл. 6). В случае препарата направленного действия ЭФР–ДР существенных различий в уровнях деградации ДР между чувствительными и резистентными клетками не наблюдалось. Низкий уровень внутриклеточной деградации ДР в составе ЭФР–ДР может рассматриваться как преимущество при использовании препарата направленного действия в качестве цитотоксического агента.

### **Накопление свободного и входящего в состав препарата направленного действия ДР в ядрах чувствительных и резистентных опухолевых клеток**

Результаты экспериментов по изучению динамики накопления ДР в ядрах чувствительных (линия MCF-7/Wt) и резистентных (линия MCF-7/AdrR) клеток при их инкубации с препаратом ЭФР–ДР и свободным ДР приведены на рис. 4. На рис. 4 А видно, что как в случае препарата направленного действия, так и свободного ДР кривые достигают плато в течение 200 мин. При этом наблюдалось примерно 42% гашение первоначальной флуоресценции ДР.  $t_{1/2}$ , т.е. время, необходимое для достижения полумаксимального уровня гашения флуоресценции, составило 38 мин для препарата ЭФР–ДР и 17 мин для свободного ДР, что отражает значительное различие в скоростях поступления препаратов в ядра клеток (табл. 7). Как видно на рис. 4 Б, кривые гашения флуоресценции при 2-х часовой инкубации резистентных к ДР клеток линии MCF-7/AdrR, в отличие от MCF-7/Wt, не достигали плато. При этом отмечалось 44% и 32%-ное гашение первоначальной флуоресценции при 2-х часовой инкубации клеток с препаратом ЭФР–ДР и свободным ДР соответственно.  $t_{1/2}$  для препарата ЭФР–ДР составило 46 мин, а для свободного ДР – 36 мин (табл. 7). Представленные данные свидетельствуют о более низких скоростях накопления препарата ЭФР–ДР в ядрах чувствительных и резистентных к ДР клеток по сравнению со свободным ДР. Различия в скоростях накопления свободного и входящего в состав препарата направленного действия антибиотика определяются как путем транслокации этих препаратов в клетку, так и особенностями их внутриклеточной компартиментализации. Свободные антрациклины быстро проникают в клетку в результате пассивной диффузии [Takahashi 1996]. Антрациклины, входящие в состав препаратов направленного действия, попадают в клетку в результате рецепторопосредованного эндоцитоза, протекающего с более низкой скоростью [Willingham 1983].



**Рис. 4.** Тушение флуоресценции ДР при инкубации опухолевых клеток карциномы молочной железы человека линий MCF-7/Wt (А) и MCF-7/AdrR (Б) со свободным и входящим в состав препарата направленного действия на основе ЭФР доксорубицином.

Примечательно, что процесс накопления ДР в ядрах чувствительных клеток проходит значительно быстрее, чем в резистентных, как при использовании препарата ЭФР–ДР, так и свободного ДР, что может быть обусловлено проявлением механизмов резистентности, препятствующих проникновению химиопрепаратов в клетку [Сергеева 1996]. Одним из факторов, определяющих уровень ЦТА препарата ЭФР–ДР в отношении чувствительных (MCF-7/Wt) и резистентных (MCF-7/AdrR) клеток, также может являться скорость поступления препарата в ядра клеток, что справедливо и для свободного ДР.

**Таблица 7. Накопление свободного и входящего в состав препарата направленного действия ДР в ядрах чувствительных и резистентных опухолевых клеток.**

Препарат / Линия клеток		ДР	ЭФР–ДР
$t_{1/2}^*$ , мин	MCF-7/Wt	17,1±0,6	38,3±0,8
	MCF-7/AdrR	36,0±0,7	46,2±1,1
С**, мкМ/10 <sup>6</sup> кл	MCF-7/Wt	0,538±0,010	0,616±0,018
	MCF-7/AdrR	0,257±0,012	0,543±0,019

\*  $t_{1/2}$  – время полумаксимального накопления ДР в ядрах опухолевых клеток.

\*\* С – концентрация связанного с ядром ДР, определенная в условиях стационарного состояния.

Как видно из табл. 7, уровень накопления ДР, входящего в состав препарата ЭФР–ДР, в ядрах клеток MCF-7/Wt и MCF-7/AdrR превышает уровень свободного антибиотика. Уровень накопления свободного ДР в ядрах клеток MCF-7/Wt был заметно выше, чем в MCF-7/AdrR, что может служить одним из объяснений резистентности клеток к цитотоксическому действию антибиотика. Уровни накопления ДР, входящего в состав препарата ЭФР–ДР, в ядрах клеток MCF-7/Wt и MCF-7/AdrR существенно не различались, т.е. не зависели от чувствительности клеток, что может служить объяснением высокой ЦТА антибиотика в отношении резистентных клеток при применении препарата направленного действия.

Для выяснения внутриклеточной локализации ДР, поступающего в клетки путем рецепторопосредованного эндоцитоза и диффузии через клеточную мембрану, мы исследовали его накопление в ядре и цитоплазме опухолевых клеток (табл. 8). После 2 ч инкубации клеток со свободным ДР и препаратом ЭФР–ДР антибиотик преимущественно локализовался в ядрах обоих типов клеток. При этом распределение свободного ДР между ядром и цитоплазмой клеток MCF-7/Wt и MCF-7/AdrR существенно различается. Так, соотношение содержания ДР в ядерной и цитоплазматической фракциях клеток MCF-7/Wt и MCF-7/AdrR составило 9,0 и 5,7 соответственно. Таким образом, по сравнению с клетками MCF-7/Wt, относительный уровень свободного ДР в ядрах клеток MCF-7/AdrR снижается, а в цитоплазме возрастает, что, очевидно, вызвано действием механизма клеточной резистентности [Сергеева 1996], препятствующего поступлению антрациклинов в ядро. В

противоположность свободному антибиотику, соотношение содержания ДР, входящего в состав препарата ЭФР–ДР, в ядерной и цитоплазматической фракциях клеток MCF-7/Wt и MCF-7/AdrR составило 3,3 и 2,8 соответственно. Таким образом, при поступлении ДР в клетку в составе конъюгата с ЭФР его содержание в ядре (табл. 7), а также уровень его относительного распределения между ядром и цитоплазмой (табл. 8) практически не зависят от чувствительности клеток к антибиотику, что может свидетельствовать о низкой эффективности действия механизма клеточной резистентности в отношении препарата направленного действия. Одним из объяснений этого может служить недоступность связанного с ЭФР и проходящего путь внутриклеточных компартментов ДР для действия мембранного насоса P170.

**Таблица 8. Распределение ДР между ядром и цитоплазмой клеток MCF-7 через 2 ч инкубации со свободным и входящим в состав препарата направленного действия ДР.**

Линия клеток	Препарат	Содержание ДР, %	
		Ядро	Цитоплазма
MCF-7/Wt	ДР	90	10
	ЭФР–ДР	77	23
MCF-7/AdrR	ДР	85	15
	ЭФР–ДР	74	26

Таким образом, особая привлекательность использования препаратов направленного действия в качестве терапевтических средств связана с возможностью значительного снижения или полного преодоления множественной лекарственной устойчивости, условием которого является дальнейшее их совершенствование.

### **Создание и исследование противоопухолевого потенциала препаратов направленного действия на основе рецепторсвязывающих пептидных фрагментов АФП, ЭФР и ТФР $\alpha$**

Продолжением вышеописанных исследований явилась попытка создания и изучения противоопухолевого потенциала препаратов направленного действия на основе рецепторсвязывающих фрагментов АФП и ЭФР. Поскольку трансформирующий фактор роста  $\alpha$  (ТФР $\alpha$ ) является физиологическим лигандом рецептора ЭФР, рецепторсвязывающий фрагмент данного белка также использовали в качестве векторного компонента препаратов направленного действия.

#### ***Синтез пептидных аналогов рецепторсвязывающих фрагментов ЭФР и ТФР $\alpha$***

В настоящем исследовании мы изучали возможность использования рецепторсвязывающих фрагментов ЭФР и ТФР $\alpha$  в качестве таких векторов. ЭФР и ТФР $\alpha$  являются естественными лигандами рецептора ЭФР [Ciardiello 2003], а

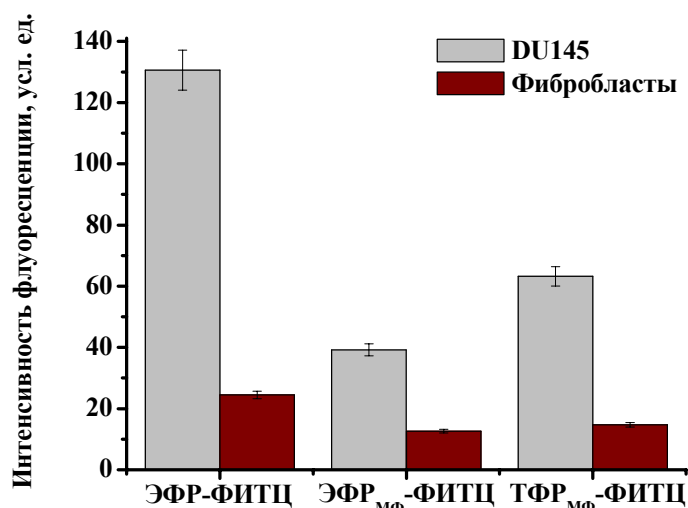
связывание как ЭФР [Ogiso 2002], так и ТФР $\alpha$  [Garrett 2002] с рецептором детально охарактеризовано. Были исследованы два пептида, полученные методом твёрдофазного пептидного синтеза, – модифицированный фрагмент ЭФР человека (рецепторсвязывающий участок ЭФР) (ЭФР<sub>МФ</sub>) и модифицированный фрагмент ТФР $\alpha$  человека (рецепторсвязывающий участок ТФР $\alpha$ ) (ТФР<sub>МФ</sub>). ЭФР<sub>МФ</sub> имел структуру H<sub>2</sub>N–MYIEALDSYAC–COOH и отличался от рецепторсвязывающего фрагмента ЭФР человека (а.о. 21-31: MYIEALDKYAC) заменой Лиз<sub>28</sub> на Сер. ТФР<sub>МФ</sub> имел структуру H<sub>2</sub>N–RFLVQEDSPA–COOH и отличался от рецепторсвязывающего фрагмента ТФР $\alpha$  человека (а.о. 22-31: RFLVQEDKPA) заменой Лиз<sub>29</sub> на Сер. Такие замены позволяют избежать взаимодействия  $\epsilon$ -аминогруппы лизина со сшивающим агентом в ходе конъюгирования пептидов. Экранирование лизина в составе пептидов может препятствовать взаимодействию конъюгатов с рецептором ЭФР и их эффективной интернализации.

### ***Получение рекомбинантного 3-го домена $\alpha$ -фетопротейна человека***

Получение рекомбинантного  $\alpha$ -фетопротейна связано с существенными трудностями ввиду высокой молекулярной массы белка и наличия в нём многочисленных углеводных компонентов и дисульфидных связей. В значительной мере избежать этих затруднений позволяет использование генно-инженерных конструкций, обеспечивающих продукцию не целого белка, а его биологически активных фрагментов. В нашей работе мы изучали потенциал АФП<sub>3д</sub>, полипептида с мол. массой около 27 кДа, как векторной молекулы для адресной доставки цитотоксических средств в малигнизированные ткани. Препарат АФП<sub>3д</sub> был любезно предоставлен сотрудниками НИИ молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова к.б.н. Гороховец Н.В. и Макаровым В.А. Рекомбинантный АФП<sub>3д</sub> выделяли из биомассы штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3), в которых он накапливался в тельцах включения. АФП<sub>3д</sub> получали из биомассы штамма-продуцента посредством ультразвуковой дезинтеграции клеток, изолирования телец включения и ренатурации рекомбинантного белка. Ренатурацию проводили с помощью серии диализов и окисления HS-групп препарата кислородом воздуха после предварительной полной денатурации АФП<sub>3д</sub> в присутствии мочевины и гуанидинхлорида. Окончательную очистку белка осуществляли гель-фильтрационной хроматографией на сорбенте Superdex 200 10/30. В результате был получен белок с мол. массой около 27 кДа (данные электрофоретического и масс-спектрального анализа). Выход ренатурированного АФП<sub>3д</sub> составил 5 мг/л культуральной среды.

### ***Исследование накопления модифицированных рецепторсвязывающих фрагментов ЭФР и ТФР $\alpha$ человека в опухолевых клетках***

Для исследования способности синтезированных пептидов к избирательному проникновению в клетки злокачественных опухолей применяли метод проточной цитофлуориметрии. В качестве стандарта при исследовании способности



**Рис. 5.** Интенсивность флуоресценции клеток DU145 после 1 ч инкубации с ЭФР–ФИТЦ, ЭФР<sub>МФ</sub>–ФИТЦ и ТФР<sub>МФ</sub>–ФИТЦ в концентрации 4 мкМ при 37°C.

рецепторопосредованного эндоцитоза. В связи с этим для исследования возможных путей поступления пептидов в клетку (рецепторопосредованный эндоцитоз или альтернативное проникновение через плазматическую мембрану) мы провели сравнительное изучение накопления флуоресцентной метки в опухолевых клетках карциномы предстательной железы человека линии DU145 и в клетках первичной культуры фибробластов человека при их инкубации с ФИТЦ-мечеными ЭФР и пептидами в различных температурных режимах.

Для обоих исследованных пептидов было показано, что уровень флуоресценции в клетках, инкубированных с ФИТЦ-мечеными пептидами при 37°C, значительно выше, чем в клетках, инкубированных при 4°C. Так, при концентрации препарата 1 мкМ интенсивность флуоресценции при 37°C для ЭФР<sub>МФ</sub>–ФИТЦ превышала интенсивность флуоресценции при 4°C на 29,2%, а для ТФР<sub>МФ</sub>–ФИТЦ – на 62,6%. При концентрации 4 мкМ интенсивность флуоресценции при 37°C для ЭФР<sub>МФ</sub>–ФИТЦ превышала интенсивность флуоресценции при 4°C на 74,8%, для ТФР<sub>МФ</sub>–ФИТЦ – на 185,2%, т.е. почти в 3 раза. Интенсивность флуоресценции клеток, обработанных ФИТЦ-мечеными пептидами в максимальной концентрации (4 мкМ), была значительно выше их аутофлуоресценции и сопоставима с уровнем флуоресценции клеток, инкубированных с ЭФР–ФИТЦ (рис. 5). Этот вывод подтверждается флуоресцентной микроскопией клеток линии DU145, инкубированных с ЭФР–ФИТЦ, ЭФР<sub>МФ</sub>–ФИТЦ и ТФР<sub>МФ</sub>–ФИТЦ (данные не показаны). В то же время интенсивность флуоресценции в фибробластах человека, инкубированных с ФИТЦ-мечеными пептидами в аналогичных концентрациях, была значительно более низкой. Так, после инкубации с ЭФР–ФИТЦ интенсивность флуоресценции фибробластов была более чем в 5 раз

синтезированных пептидов к связыванию с рецептором ЭФР на поверхности клеток карциномы предстательной железы использовали ФИТЦ-меченый ЭФР. Известно, что при 4°C наблюдается связывание мембранных рецепторов с их лигандами на поверхности клеток, но интернализации лиганд-рецепторных комплексов не происходит. При 37°C, напротив, после связывания с рецептором происходит эффективная интернализация лигандов, поступающих в клетку путем



слабее, чем клеток DU145. Интенсивность флуоресценции фибробластов после инкубации с ЭФР<sub>МФ</sub>-ФИТЦ и ТФР<sub>МФ</sub>-ФИТЦ была ниже интенсивности флуоресценции опухолевых клеток DU145 в 3,1 и 4,3 раза соответственно (рис. 5). Полученные результаты свидетельствуют о способности данных пептидов специфически проникать в клетки карциномы предстательной железы человека путём рецепторопосредованного эндоцитоза.

### **Конъюгирование ДР с векторными пептидами**

С целью изучения возможности использования синтезированных пептидов в качестве векторов для направленного транспорта нами были синтезированы конъюгаты пептидов АФП<sub>ЗД</sub>, ЭФР<sub>МФ</sub> и ТФР<sub>МФ</sub>, а также ЭФР, с противоопухолевым антибиотиком антрациклинового ряда доксорубицином. Конъюгаты были получены с помощью сшивающего реагента РДРН (3-2(пиридилдитио)пропионил гидразид). Мольное соотношение ЭФР:ДР, ЭФР<sub>МФ</sub>:ДР, ТФР<sub>МФ</sub>:ДР и АФП<sub>ЗД</sub>:ДР для всех полученных препаратов составляло 1:1.

### **Определение ЦТА препаратов направленного действия на основе АФП<sub>ЗД</sub>, ЭФР, ЭФР<sub>МФ</sub> и ТФР<sub>МФ</sub>**

Полученные препараты исследовали на наличие специфической ЦТА *in vitro* на культурах ряда клеток злокачественных опухолей (карцинома предстательной железы человека DU145, эпидермоидная карцинома человека А431, карцинома молочной железы человека MCF-7 и фибросаркома человека HT1080), а также на нераковых клетках, в качестве которых использовали первичную культуру фибробластов человека и линию мышинных эндотелиоцитов SVEC4-10. Препараты проявляли выраженную дозозависимую ЦТА в отношении всех четырех линий опухолевых клеток, фигурировавших в исследовании. При этом уровень ЦТА препаратов ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР и ТФР<sub>МФ</sub>-ДР был сравним с активностью препарата ЭФР-ДР. Данные о ЦТА всех препаратов на основе векторных пептидов в отношении исследованных клеточных линий обобщены в табл. 9.

**Таблица 9. ЦТА препаратов направленного действия на основе ЭФР, ЭФР<sub>МФ</sub>, ТФР<sub>МФ</sub> и АФП<sub>ЗД</sub> и ДР в отношении раковых и нормальных клеток человека и мыши (приведены средние значения IC<sub>50</sub> по данным трех независимых экспериментов).**

Линия клеток	IC <sub>50</sub> , мкМ				
	ДР	ЭФР-ДР	ЭФР <sub>МФ</sub> -ДР	ТФР <sub>МФ</sub> -ДР	АФП <sub>ЗД</sub> -ДР
<b>DU145</b>	0,065	0,055	0,105	0,090	0,172
<b>A431</b>	0,027	0,021	0,040	0,023	0,137
<b>MCF-7</b>	0,051	0,057	0,133	0,112	0,114
<b>HT1080</b>	0,079	0,064	0,258	0,149	0,094
<b>Фибробласты</b>	0,071	2,29	2,14	2,05	1,14
<b>SVEC4-10</b>	0,0075	0,133	0,495	0,611	0,234

Наибольшую активность ДР и препараты направленного действия на основе векторных пептидов – лигандов рецептора ЭФР – проявляли по отношению к клеточной линии A431. При этом ЦТА препаратов ЭФР–ДР, ЭФР<sub>МФ</sub>–ДР и ТФР<sub>МФ</sub>–ДР была близка к активности свободного ДР (табл. 9). Следует учитывать, что *in vivo* свободный ДР легко проникает во все типы раковых и нормальных клеток, что является причиной возникновения побочных эффектов. В противоположность этому, препараты на основе пептидов будут главным образом проникать лишь в опухолевые клетки, гиперэкспрессирующие рецептор ЭФР. Поэтому их цитотоксическое действие на нормальные клетки будет минимальным. Таким образом, несмотря на близкие значения ЦТА препаратов направленного действия и свободного ДР *in vitro*, преимущества направленных препаратов над ДР при их терапевтическом применении *in vivo* представляются очевидными.

Исследования ЦТА препаратов в отношении опухолевых клеток линии DU145 (карцинома предстательной железы человека) показали, что активность ЭФР–ДР (IC<sub>50</sub> 0,055 мкМ) превышала как активность препаратов ЭФР<sub>МФ</sub>–ДР (IC<sub>50</sub> 0,105 мкМ) и ТФР<sub>МФ</sub>–ДР (IC<sub>50</sub> 0,090 мкМ), так и активность свободного ДР (IC<sub>50</sub> 0,065 мкМ). Уровень ЦТА препаратов ЭФР<sub>МФ</sub>–ДР и ТФР<sub>МФ</sub>–ДР, напротив, был несколько ниже, чем у свободного ДР.

В отношении клеточной линии MCF-7 (карцинома молочной железы человека) ЦТА препарата ЭФР–ДР (IC<sub>50</sub> 0,057 мкМ) была близка к активности свободного ДР (IC<sub>50</sub> 0,051 мкМ). Активность препаратов ЭФР<sub>МФ</sub>–ДР и ТФР<sub>МФ</sub>–ДР была более чем в два раза ниже (IC<sub>50</sub> 0,133 и 0,112 мкМ соответственно).

В отношении клеток фибросаркомы человека линии HT1080 ЦТА препарата ЭФР–ДР была близка к активности свободного ДР, в то время как активность ЭФР<sub>МФ</sub>–ДР и ТФР<sub>МФ</sub>–ДР была ниже активности свободного антибиотика в 3,2 и 1,9 раза, соответственно (табл. 9). Возможно, такой результат говорит о специфическом рецепторном портрете клеток линии HT1080, которые, не являясь клетками эпителиального гистогенеза, могут иметь особенности в экспонировании и функциональной активности рецепторов ЭФР.

Для исследования действия препаратов на нормальные клетки человека в качестве модельных культур использовали первичную культуру фибробластов человека и клетки эндотелия лимфатических сосудов мыши SVEC4-10, имеющие нормальный фенотип, при котором экспонирование рецептора ЭФР на поверхности мембраны минимально [Ciardiello and Tortora 2001].

ЦТА всех исследованных препаратов направленного действия в отношении клеток SVEC4-10 превышала активность в отношении фибробластов. Как видно из табл. 9, при изучении ЦТА синтезированных препаратов на основе пептидов на первичной культуре фибробластов человека IC<sub>50</sub> не достигалась даже при концентрации 2 мкМ, хотя для свободного ДР IC<sub>50</sub> составляла лишь 0,071 мкМ. Таким образом, ЦТА свободного ДР оказалась значительно более высокой, чем активность каждого из конъюгатов. Клетки эндотелия мыши были выбраны нами в качестве

объекта исследования в силу необходимости установить возможное цитотоксическое действие препаратов ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР и ТФР<sub>МФ</sub>-ДР на стенки сосудов экспериментальных животных, поскольку при исследованиях *in vivo* такие конъюгированные препараты, как и свободный ДР, будут вводиться внутривенно. ЦТА ДР при исследованиях на клетках эндотелия мыши линии SVEC4-10 была очень высокой (IC<sub>50</sub> 0,0075 мкМ). ЦТА конъюгированных форм антибиотика была в 60–80 раз ниже по сравнению со свободным ДР (IC<sub>50</sub> препаратов направленного действия составляла 0,495 мкМ в случае ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР и 0,611 мкМ в случае ТФР<sub>МФ</sub>-ДР). ЦТА препарата ЭФР-ДР по отношению к клеточной линии SVEC4-10 была ниже активности свободного ДР в 17 раз. Очевидно, что свободный ДР легко проникал как в фибробласты, так и в клетки SVEC4-10 путём диффузии и накапливался в них, оказывая мощный цитотоксический эффект. ДР, конъюгированный с ЭФР и пептидами, в отличие от свободного антибиотика, может проникать лишь в клетки, несущие соответствующие рецепторы. В связи с этим при действии препаратов направленного действия нормальные клетки, в отличие от опухолевых, практически не поражаются или поражаются в незначительной степени, что является подтверждением избирательности цитотоксического действия таких препаратов.

В целом данные по активности препаратов ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР и ТФР<sub>МФ</sub>-ДР в отношении раковых клеток различных линий соответствуют общим принципам действия противоопухолевых препаратов направленного действия [Ciardiello and Tortora 2001, Moskaleva 1997]. Несмотря на то, что в большинстве случаев цитотоксическая активность исследуемых препаратов в отношении опухолевых клеток не превышала активности свободного антибиотика, преимущества препаратов направленного действия над обычными химиопрепаратами должны проявиться *in vivo*.

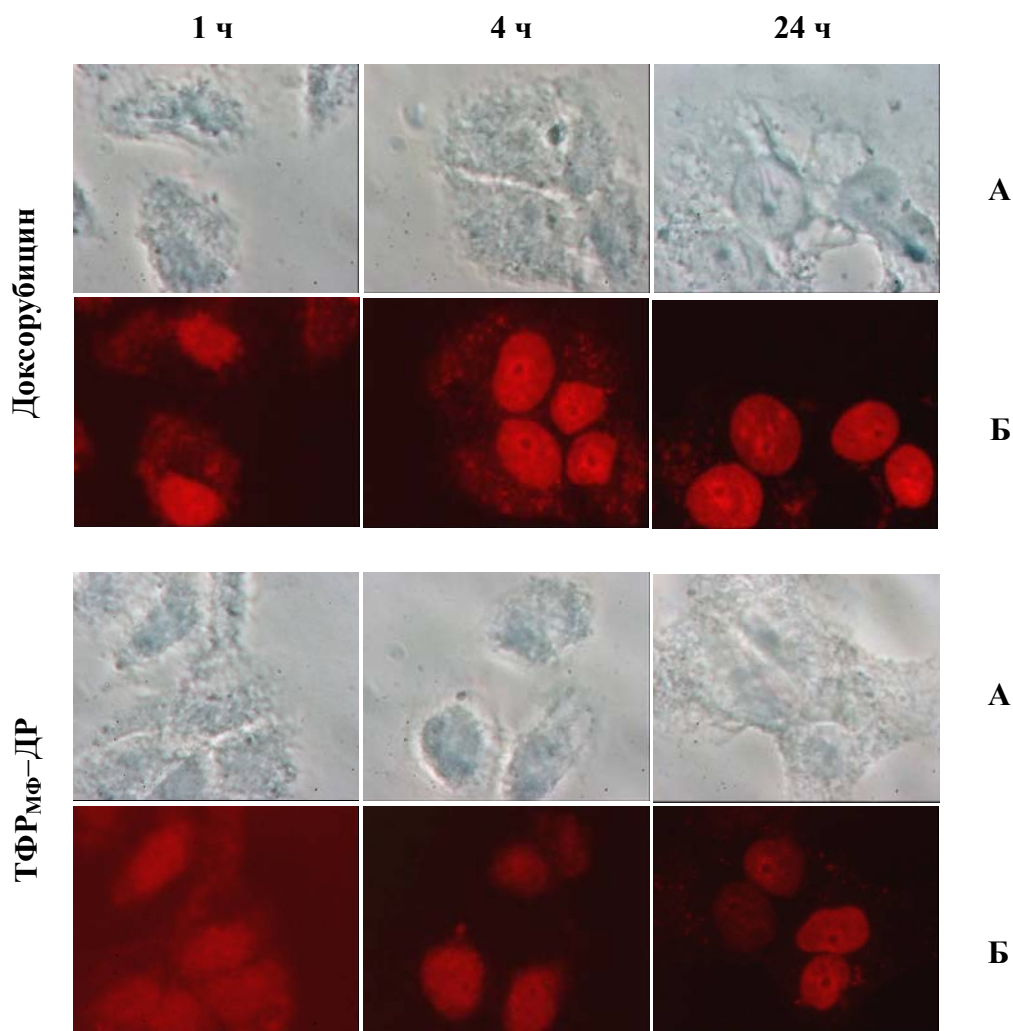
Препарат направленного действия на основе векторного пептида АФП<sub>3д</sub> также проявлял выраженную дозозависимую ЦТА в отношении всех исследованных линий раковых клеток. Как видно из табл. 9, наибольшую активность препарат АФП<sub>3д</sub>-ДР проявлял в отношении клеточной линии фибросаркомы человека HT1080 (IC<sub>50</sub> 0,094 мкМ). Специфичность действия данного препарата подтверждается тем, что его ЦТА в отношении нормальных клеток была значительно ниже, чем для раковых (IC<sub>50</sub> для фибробластов составляла 1,14 мкМ). В то же время ЦТА препарата в отношении эндотелиальных клеток линии SVEC4-10 (IC<sub>50</sub> 0,234 мкМ) была довольно близка к цитотоксическим концентрациям для клеточных линий злокачественных опухолей. Предположительно такой результат объясняется тем, что эндотелиоциты продуцируют большие количества мембранных АФП-связывающих белков [Mizejewski 2001], благодаря чему препарат АФП<sub>3д</sub>-ДР поступает в клетки линии SVEC4-10 путём рецепторопосредованного эндоцитоза.

Как было ранее показано нами, препарат АФП-ДР проявлял высокую ЦТА в отношении клеток MCF-7 (IC<sub>50</sub> 0,045 мкМ) и SKOV3 (IC<sub>50</sub> 0,29 мкМ). Результаты по ЦТА препарата АФП<sub>3д</sub>-ДР в отношении раковых клеток (табл. 9) показывают, что его активность значительно ниже, чем активность АФП-ДР; однако, учитывая

продемонстрированную низкую активность АФП<sub>3Д</sub>-ДР в отношении нормальных клеток, сравнительно с активностью на раковых клетках, можно предполагать терапевтические преимущества АФП<sub>3Д</sub>-ДР над свободным ДР.

***Микроскопическое исследование динамики интернализации и внутриклеточного распределения препарата ТФР<sub>МФ</sub>-ДР в раковых клетках***

Нами также была изучена динамика внутриклеточного накопления препаратов направленного действия в опухолевых клетках на примере препарата ТФР<sub>МФ</sub>-ДР. Методом флуоресцентной микроскопии было изучено поступление и внутриклеточное распределение препарата ТФР<sub>МФ</sub>-ДР в клетки линии DU145 при инкубации в течение 1, 4 и 24 ч (рис. 6).



**Рис. 6.** Микрофотографии клеток карциномы предстательной железы человека линии DU145 после их инкубации с ДР и препаратом ТФР<sub>МФ</sub>-ДР в течение различных промежутков времени. Фазово-контрастная (А) и флуоресцентная (Б) микроскопия.

Свободный ДР быстро проникал в клетки, и уже через 1 ч инкубации флуоресценция детектировалась преимущественно в ядрах (рис. 6). Напротив, ДР в составе препарата ТФР<sub>МФ</sub>-ДР после 1 ч инкубации был распределён по всему объёму цитоплазмы. Через 4 ч и особенно через 24 ч инкубации различия во внутриклеточной компартиментализации свободного и конъюгированного с ТФР<sub>МФ</sub> ДР практически нивелировались (рис. 6). Очевидно, что в процессе инкубации ДР поступает в клетку, накапливается в ядре, где и проявляет своё цитотоксическое действие. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что конъюгирование ДР с векторным пептидом не препятствует реализации химиотерапевтическим компонентом, в данном случае ДР, своего противоопухолевого цитотоксического действия.

Таким образом, представленные результаты позволяют сделать вывод о том, что пептиды ЭФР<sub>МФ</sub>, ТФР<sub>МФ</sub> и АФП<sub>3д</sub> обладают высоким векторным потенциалом для доставки цитотоксических химиопрепаратов в клетки злокачественных опухолей человека эпителиального и мезенхимального гистогенеза. Для дальнейшего изучения противоопухолевого потенциала полученных препаратов проводили испытания на мышах с привитыми опухолями.

**Исследование противоопухолевой активности препаратов направленного действия на основе векторных пептидов на мышах с привитыми солидными опухолями**

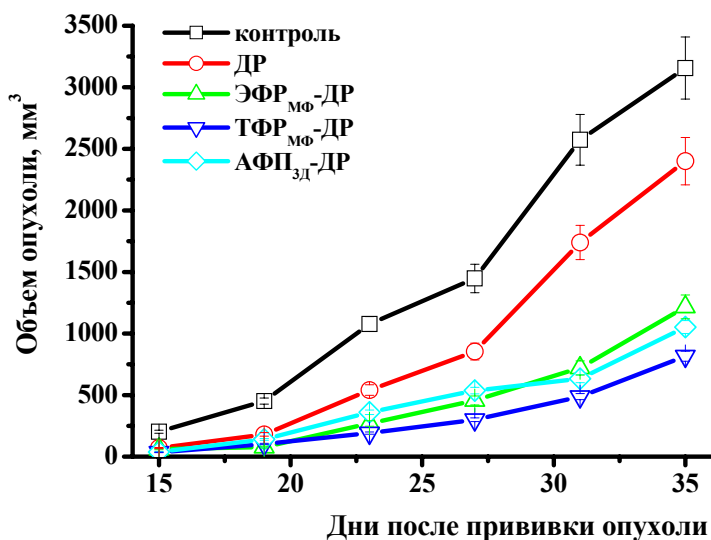


Рис. 7. Динамика роста привитых солидных опухолей меланомы В16 у мышей при терапии ДР и препаратами направленного действия на основе векторных пептидов.

Сравнительное исследование противоопухолевой активности ДР и препаратов направленного действия на основе векторных пептидов ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР и АФП<sub>3д</sub>-ДР проводили на мышах с модельными солидными опухолями меланомы В16.

Противоопухолевые препараты вводили животным внутривенно каждые 4 дня, начиная со 2-го дня после инъекции опухолевых клеток. Всего осуществляли 3 инъекции препаратов. Применение препаратов направленного действия на

основе ДР позволяет адресно доставлять противоопухолевый антибиотик в раковые ткани организма и повысить эффективность терапии. В нашем исследовании это подтверждается значительно большим торможением роста опухолей у мышей, получавших препараты ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР и АФП<sub>3д</sub>-ДР по сравнению с мышами, которым вводили раствор свободного ДР (рис. 7, табл. 10). Как видно на рис. 7, все три исследуемых препарата направленного действия проявляли довольно близкую терапевтическую эффективность (торможение роста опухоли по сравнению с контролем во всех трёх группах животных сопоставимо (табл. 10)). Наибольшей терапевтической эффективностью обладал препарат ТФР<sub>МФ</sub>-ДР. Препараты также увеличивали СПЖ экспериментальных животных. В табл. 10 представлены результаты по УСПЖ при терапии мышей ДР и препаратами ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР и АФП<sub>3д</sub>-ДР. Как видно из таблицы, наибольшее УСПЖ животных вызывал препарат ТФР<sub>МФ</sub>-ДР, что согласуется с данными по торможению опухолевого роста у мышей (рис. 7).

**Таблица 10. Эффективность противоопухолевого действия препаратов ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР и АФП<sub>3д</sub>-ДР в отношении мышинной меланомы В16 *in vivo* в сравнении с конъюгированным ДР.**

Препарат	ТРО*, %	СПЖ, дни	УСПЖ, %
Контроль	–	33,4±2,0	–
ДР	32,4	38,5±1,1	15,2
ЭФР <sub>МФ</sub> -ДР	72,0	43,6±1,2	30,6
ТФР <sub>МФ</sub> -ДР	81,1	46,2±1,2	38,4
Конъюгат АФП <sub>3д</sub> -ДР	75,4	45,4±1,5	35,9

\* Данные на 31 день эксперимента

### **Получение и исследование цитотоксической активности антиангиогенных препаратов**

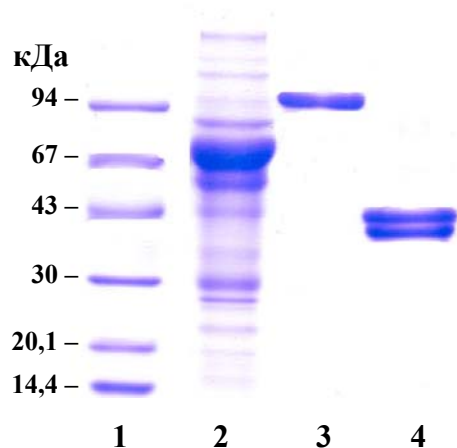
Поддержание роста злокачественных новообразований тесно связано с процессом ангиогенеза, заключающегося в образовании кровеносной сети, питающей опухоль. При развитии злокачественного процесса сосуды мигрируют к опухоли, а опухоль, в свою очередь, к сосудам. Ингибирование роста сосудов приводит к остановке роста опухоли или ее регрессии. Ангиостатин и эндостатин являются высокопотентными антиангиогенными препаратами, специфически ингибирующими пролиферацию эндотелия кровеносных сосудов опухоли, препятствуя таким образом ее нормальной оксигенации и питанию. Чрезвычайно важно, что данные препараты действуют на организм без проявления токсических эффектов и развития резистентности. Однако особенности распределения и выведения ангиостатина и эндостатина из организма при их экзогенном введении обуславливают необходимость их применения в высоких терапевтических дозах (от 10 до 100 мг/кг/день). Решением данной проблемы могла бы служить направленная доставка препаратов к опухолевым сосудам с помощью липосом. Известно, что липосомные препараты способны

накапливаться также в областях, характеризующихся изолированной васкулатурой, таких как опухоли [Drummond 1999]. Поскольку капилляры, образовавшиеся в результате опухолевого неоангиогенеза, характеризуются наличием в слое эндотелия большого количества пор размером до 800 нм, липосомы, размеры которых традиционно не превышают 500 нм, при циркуляции в кровотоке будут проникать преимущественно в солидные опухоли [Allen and Cullis 2004], обеспечивая направленный транспорт антиангиогенного препарата. В связи с этим другой целью нашего исследования являлось получение липосомных форм ангиостатина и эндостатина и исследование их противопухоловой активности.

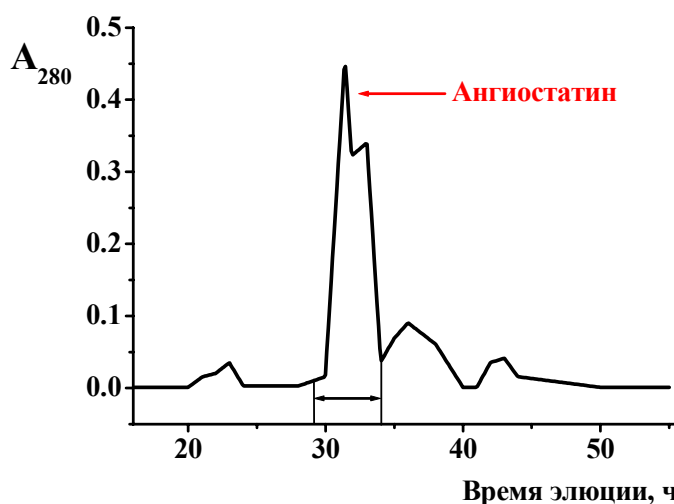
### **Выделение и очистка ангиостатина**

Ангиостатин имеет сложную пространственную конформацию и содержит 12 дисульфидных связей, что крайне затрудняет получение ренатурированного белка в генно-инженерных продуцентах. Для изучения терапевтического потенциала данного белка мы выделяли нативный ангиостатин из плазмы крови человека. Нами была модифицирована ранее описанная методика [O'Reilly 1996] получения ангиостатина, что позволило получать нативный белок в достаточных для исследований количествах.

Плазминоген выделяли из плазмы крови человека с помощью аффинной хроматографии на колонке с L-лизин-сефарозой. Фракция плазминогена, собранная с колонки, представляла собой концентрированный раствор высокоочищенного белка (рис. 8, дорожка 3). Для частичного протеолиза плазминогена использовали эластазу свиньи; после 12 ч протеолиза реакционную смесь наносили на колонку с L-лизин-



**Рис. 8.** Электрофореграмма плазминогена и ангиостатина человека. 1 – стандарты молекулярных масс; 2 – плазма крови человека; 3 – плазминоген; 4 – ангиостатин.



**Рис. 9.** Профиль элюции ангиостатина с колонки с Sephacryl S-300. Стрелками обозначены границы сбора фракции ангиостатина.

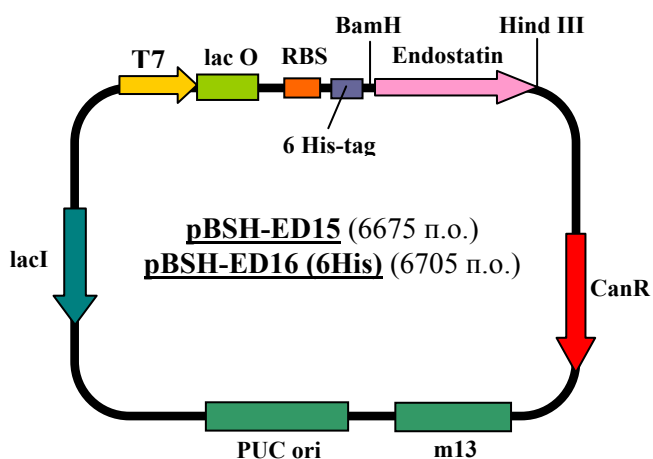
сефарозой при 4°C. Ангиостатин, посредством присутствующих в его молекуле сайтов связывания с лизином, эффективно сорбировался на колонке. Белок элюировали 0,2 М раствором 6-аминокапроновой кислоты в фосфатно-солевом буфере. Однако чистота препарата на этом этапе была недостаточной, поэтому проводили дополнительную очистку ангиостатина с помощью гель-фильтрационной хроматографии на носителе Sephacryl S-300 (рис. 9).

Как показал электрофоретический анализ конечного продукта (рис. 8, дорожка 4), полученный ангиостатин представляет собой смесь двух изоформ белка с мол. массами 38 и 40 кДа (различия относятся к аминокислотной последовательности С-конца, поскольку при действии эластазы на плазминоген протеолиз возможен более чем в одном сайте [Ji 1998]. С использованием данной методики из 1 л плазмы крови человека удаётся выделить 180–190 мг высокоочищенного плазминогена. Это выход, близкий к максимально возможному, поскольку концентрация плазминогена в плазме крови взрослого человека составляет 180–200 мкг/мл, или 1,5–2 мкМ [Castellino 1984]. Количество ангиостатина, получаемого ограниченным протеолизом плазминогена, варьирует в зависимости от ряда условий и составляет (после всех стадий очистки) 2–3 мг из 10 мг плазминогена. Таким образом, из 1 л плазмы крови человека получали 35–55 мг гомогенного препарата ангиостатина.

#### **Получение рекомбинантного эндостатина человека**

Эндостатин человека содержит две внутримолекулярные дисульфидные связи и имеет относительно простую пространственную конфигурацию. В биологическом материале содержание эндостатина крайне низкое, поэтому разработка препаративных методов получения нативного эндостатина нецелесообразна. В связи с этим получение эндостатина для исследования его противоопухолевого потенциала осуществлялось нами с помощью генно-инженерных методов.

В качестве экспрессионной системы был выбран штамм *E. coli* BL21(DE3). В качестве источника гена эндостатина была использована библиотека генов человека. Фрагмент гена коллагена XVIII, соответствующий последовательности, кодирующей эндостатин, был выделен методом

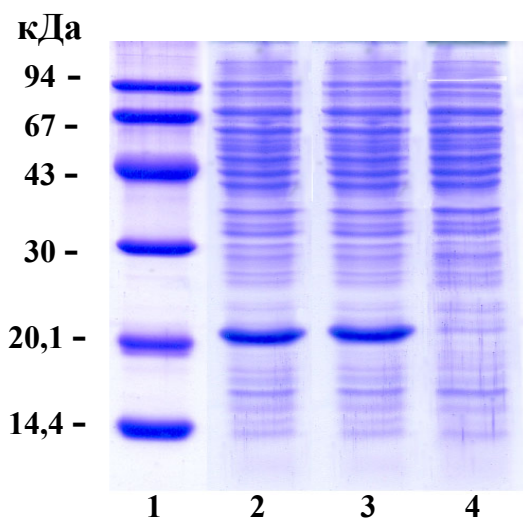


**Рис. 10. Экспрессионный вектор, кодирующий биосинтез рекомбинантного эндостатина человека в штамме-продуценте *E. coli* BL21(DE3).**



амплификации. Для осуществления продукции эндостатина человека в этом штамме была сконструирована плазмидная ДНК, содержащая ген эндостатина человека и названная pBSH-ED15 (рис. 10). Кроме того, была сконструирована плазмидная ДНК, аналогичная pBSH-ED15, но дополнительная включающая нуклеотидную последовательность, кодирующую шесть N-концевых остатков гистидина (6-His-tag) и слитую с ними последовательность -(Асп)<sub>3</sub>-Лиз- (сайт расщепления энтерокиназой). Полученный вектор назвали pBSH-ED16 (рис. 10).

На последующем этапе подбирали подходящий штамм-продуцент для экспрессии целевого белка. Уровень экспрессии эндостатина человека определяли в различных штаммах *E. coli*, содержащих плазмиду pBSH-ED15. В результате проведенного скрининга штаммов был выбран оптимальный продуцент – штамм *E. coli* BL21(DE3), обеспечивающий высокий и стабильный уровень экспрессии целевого белка. Экспрессию гена эндостатина человека осуществляли в штамме *E. coli*, трансфицированном рекомбинантной плазмидой pBSH-ED15 или pBSH-ED16, в культуральной среде, сначала в отсутствие индуктора *lac*-промотора изопропилтио- $\beta$ -D-галактопиранозида (ИПТГ). По достижении мутности среды OD<sub>600</sub> 0,4–0,6 добавляли ИПТГ до концентрации 0,1–0,3 мМ и продолжали экспрессию под контролем индуцированного *lac*-промотора.



**Рис. 11.** Электрофореграмма тотальных лизатов клеток *E. coli* штаммов BL21(DE3), трансформированных экспрессионными векторами эндостатина человека. 1 – стандарты молекулярных масс; 2 – штамм, содержащий плазмиду pBSH-ED15; 3 – штамм, содержащий плазмиду pBSH-ED16; 4 – штамм, не несущий плазмид pBSH-ED15 или pBSH-ED16.

Продукцию белка ожидаемой мол. массы (20 кДа) контролировали с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ в присутствии ДСН. Как следует из данных, представленных на рис. 11, в клетках *E. coli* с плазмидами pBSH-ED15 и pBSH-ED16 наблюдается эффективный биосинтез рекомбинантного эндостатина.

Разрушение клеточных оболочек, дезинтеграцию клеток, выделение цитоплазматических телец включения, начальные этапы очистки и ренатурацию эндостатина проводили для целевых продуктов экспрессии плазмид pBSH-ED15 и pBSH-ED16 одинаковым образом. Окончательная очистка проводилась различными методами, исходя из особенностей структурной организации получаемых белков.

В клетках штаммов-продуцентов с плазмидами pBSH-ED15 и pBSH-ED16 рекомбинантный эндостатин экспрессируется в виде нерастворимых

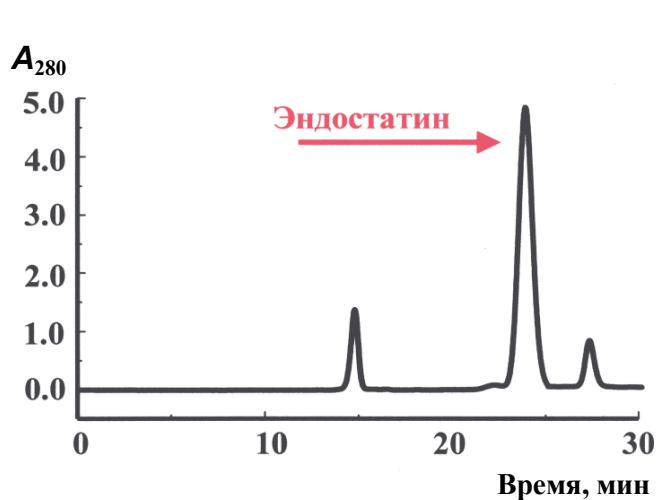


Рис. 12. Профиль элюции рекомбинантного эндостатина человека с колонки Superose 12.

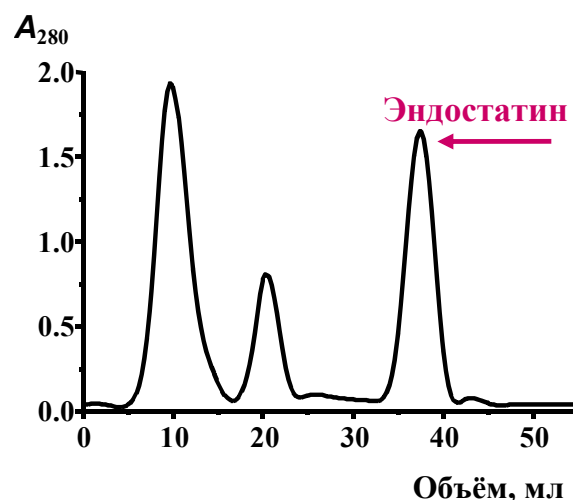


Рис. 13. Профиль элюции рекомбинантного эндостатина с колонки с Ni-NTA-агарозой.

телец включения, в которых белок присутствует в денатурированной неактивной форме. Для выделения телец включения из бактериальных клеток был избран подход, основанный на деструкции клеток ультразвуком.

Для увеличения эффективности разрушения клеток в среду вводили детергент натрия дезоксихолат и фермент лизоцим. Затем тельца включения отделяли от клеточного дезинтеграта центрифугированием, и обрабатывали препарат телец включения, находящихся в растворе детергента, ультразвуком с последующим центрифугированием и отделением нерастворившихся фрагментов клеточных структур и прочих примесей от целевого продукта.

Очистку целевого продукта, полученного экспрессией плазмидной ДНК рBSH-ED15, осуществляли методом гель-фильтрационной хроматографии с помощью системы FPLC на сорбенте Superose 12 (рис. 12). Уровень продукции эндостатина человека в штамме *E. coli*, трансфицированном плазмидой рBSH-ED15, составлял около 70 мг/л культуры.

Очистку целевого продукта, полученного экспрессией плазмидной ДНК рBSH-ED16, осуществляли методом катионообменной хроматографии на агарозном носителе (рис. 13). Уровень продукции эндостатина человека в штамме *E. coli*, трансформированном плазмидой рBSH-ED16, составлял около 80 мг/л культуры.

Ренатурацию рекомбинантного эндостатина проводили с помощью серии диализов. На первых этапах в рекомбинантном белке с помощью дитиотреитола восстанавливали все дисульфидные связи. Затем препарат подвергали медленному окислению под воздействием кислорода воздуха и редокс-пары глутатиона. Количество не окислившихся HS-групп в препаратах очищенного белка определяли, используя реактив Элмана. Было установлено, что степень ренатурации рекомбинантного эндостатина составляла более 95 % как для продукта экспрессии плазмиды рBSH-ED15, так и продукта экспрессии плазмиды рBSH-ED16.

На рис. 14 представлены данные электрофоретического анализа конечного препарата эндостатина в 15 % ПААГ в присутствии 0,1 % ДСН. Как видно из представленных данных, оба препарата представляют собой практически гомогенные белки (чистота более 99 %) с мол. массой ~ 20 кДа, соответствующей массе нативного эндостатина человека. Благодаря наличию в рекомбинантном эндостатине, кодируемом вектором рBSH-ED16, сайта протеолиза энтерокиназой, последовательность 6-His может быть отщеплена от целевого белка после его очистки на Ni-NTA-агарозе, что уменьшит антигенные свойства рекомбинантного препарата.

### Исследование ЦТА ангиостатина и эндостатина *in vitro*

Антиангиогенные полипептиды – ангиостатин и эндостатин – являются специфическими ингибиторами пролиферации эндотелиоцитов, в которых они вызывают апоптоз [Dhanabal 1999, Veitonmäki 2004]. Для подтверждения биологической активности получаемых ангиостатина и эндостатина мы инкубировали растворы этих белков с эндотелиальными клетками различных линий. Полученные результаты представлены на рис. 15.

Как видно на рис. 15 А, нативный ангиостатин человека оказывал дозозависимое цитотоксическое действие на все три типа исследовавшихся эндотелиальных клеток. Наибольшую ЦТА ангиостатин проявлял в отношении клеток аорты быка линии АВАЕ ( $IC_{50}$  0,071 мкМ). На рис. 15 Б представлены результаты по ЦТА рекомбинантного эндостатина человека, проявляемой белком в отношении эндотелиальных клеток. Наибольший цитотоксический эффект эндостатин оказывал в отношении линии эндотелиоцитов пупочной вены человека HUVEC ( $IC_{50}$  0,017 мкМ). Близкую ЦТА эндостатин проявлял в отношении клеточной линии АВАЕ ( $IC_{50}$  0,025 мкМ). В отношении клеток линии SVEC4-10 ЦТА эндостатина ( $IC_{50}$  = 0,064 мкМ) была

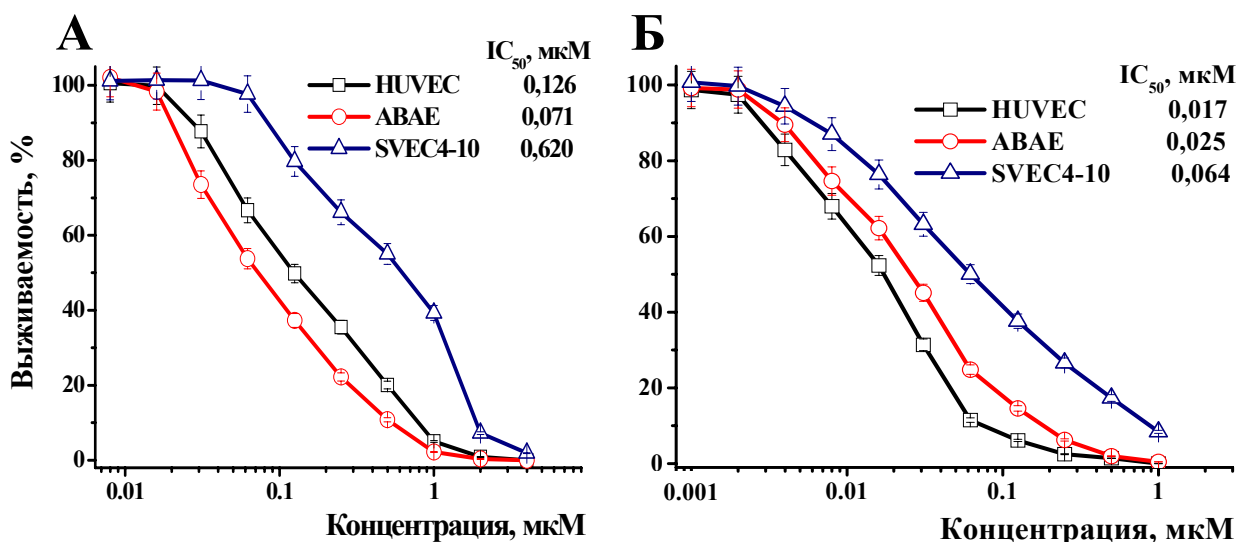


Рис. 15. ЦТА ангиостатина (А) и эндостатина (Б) в отношении эндотелиальных клеток линий HUVEC, АВАЕ и SVEC4-10.

значительно выше, чем у ангиостатина, что, вероятно, объясняется различиями в мембранных рецепторах и индуцируемых внутриклеточных сигнальных путях двух антиангиогенных полипептидов. Таким образом, оба белка проявляют выраженную антиангиогенную активность в отношении различных линий эндотелиальных клеток, что характеризует их в качестве эффективных антиангиогенных агентов.

Для подтверждения специфичности действия ангиостатина и эндостатина человека мы инкубировали растворы этих белков с нормальными клетками – гладкомышечными клетками аорты быка линии bSMC и фибробластами человека, а также с клетками злокачественных опухолей эпителиального гистогенеза линий DU145 и MCF-7. Полученные результаты представлены на рис. 16 и 17.

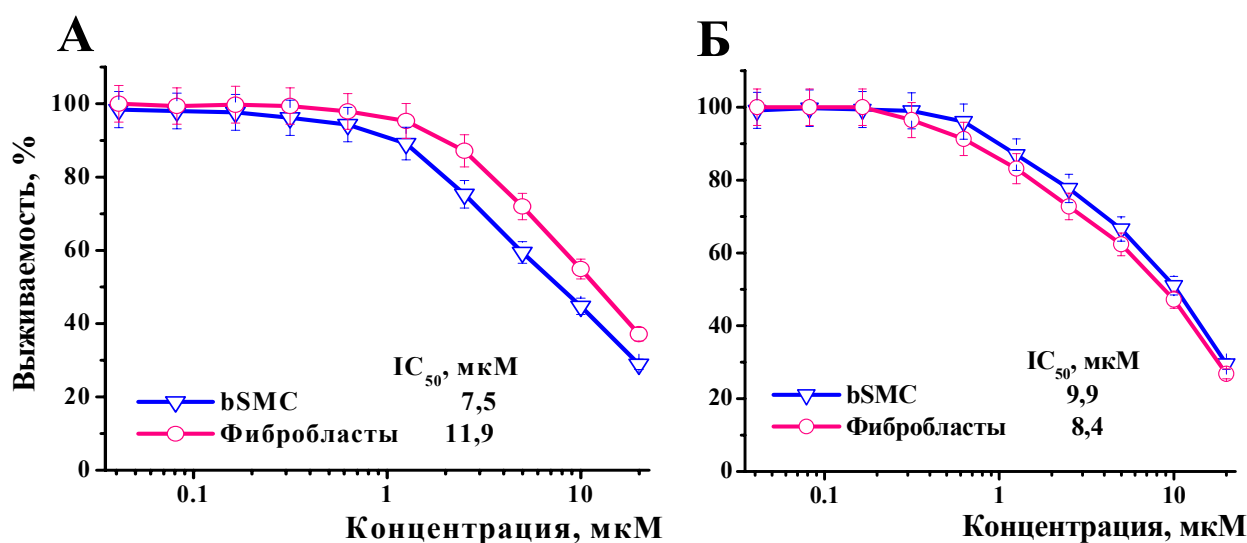


Рис. 16. ЦТД ангиостатина (А) и эндостатина (Б) в отношении бычьих гладкомышечных клеток линии bSMC и фибробластов человека.

Как следует из данных, представленных на рис. 16, и ангиостатин, и эндостатин, проявляли цитотоксическое действие на гладкомышечные клетки и фибробласты только в очень высоких (> 5 мкМ) концентрациях. В тех дозах, в которых эти ингибиторы опухолевого ангиогенеза применяются в экспериментальной терапии (< 1 мкМ), они никак не влияли на жизнедеятельность нормальных клеток. По-видимому, цитотоксический эффект очень высоких доз антиангиогенных полипептидов объясняется неспецифическим (например, увеличение осмотического давления среды) подавлением жизнедеятельности нормальных клеток и не имеет физиологического значения.

Подобный эффект наблюдали при действии ангиостатина и эндостатина на раковые клетки человека – карциномы линий DU145 и MCF-7: В дозах менее 1 мкМ оба белка никак не влияли на пролиферацию данных клеточных линий; цитотоксическое действие проявлялось только в дозах более 7 мкМ (рис. 17). По-

видимому, в таких дозах ЦТА препарата практически полностью обусловлена неспецифическим подавлением жизнеспособности клеток в культуре.

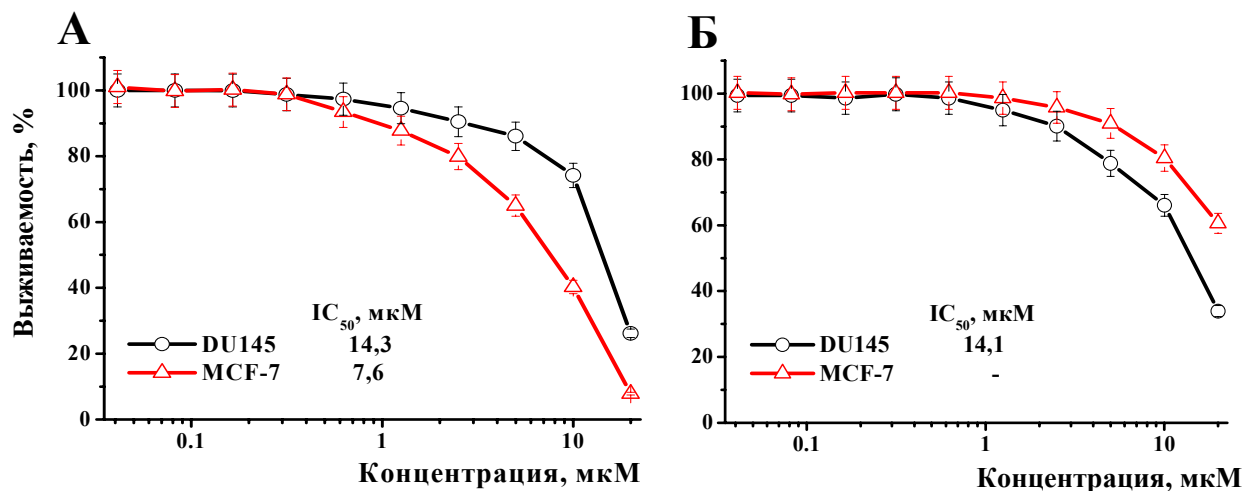


Рис. 17. ЦТА ангиостатина (А) и эндостатина (Б) в отношении раковых клеток человека линий DU145 и MCF-7.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о высокой специфичности действия полученных ангиостатина и эндостатина человека по отношению к эндотелию сосудов. Можно предполагать, что при введении данных ингибиторов ангиогенеза в организм животных или человека они будут оказывать влияние только на эндотелиоциты опухолевых сосудов, подавляя пролиферацию клеток злокачественных опухолей не прямо, а опосредованно.

### Получение липосомных форм ангиостатина и эндостатина и исследование их противоопухолевой активности *in vivo*

Для получения липосомных форм ангиостатина и эндостатина применяли метод экструзии. Липосомы получали ультразвуковой обработкой дисперсии яичный фосфатидилхолин–холестерин–белок с последующим многократным продавливанием через ядерный поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм. В результате размер полученных липосом был строго фиксированным и составлял 100 нм. Такой размер позволяет липосомным микровезикулам относительно свободно проходить через стенки кровеносных капилляров и накапливаться в тканях, где инкапсулированный терапевтический агент высвобождается. Поскольку капилляры, образовавшиеся в результате опухолевого неоангиогенеза, характеризуются наличием в слое эндотелия большого количества пор размером до 800 нм, липосомы при циркуляции в кровотоке будут проникать преимущественно в солидные опухоли [Drummond 1999, Allen 2004, Vasir 2005], обеспечивая направленный транспорт антиангиогенных полипептидов.

Липосомы, полученные в данной работе, отличались следующими характеристиками: суммарное содержание липидов (фосфатидилхолина и холестерина)

в липосомных формах ангиостатина и эндостатина было одинаковым и составляло 25 мг/мл суспензии, содержание ангиостатина в соответствующих липосомах – 5,2 мг/мл, содержание эндостатина в соответствующих липосомах – 3,4 мг/мл.

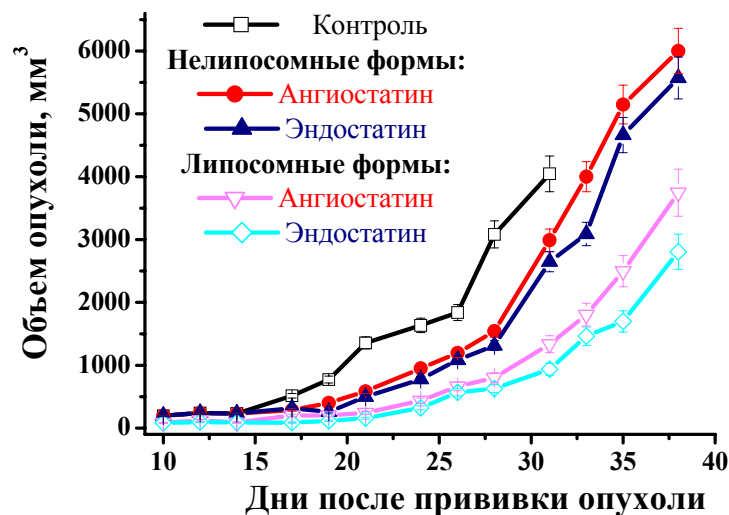


Рис. 18. Влияние липосомных и нелипосомных форм ангиостатина и эндостатина на рост опухолей меланомы B16 у мышей.

повысить терапевтическую эффективность. В нашем исследовании это подтверждается значительно большим подавлением роста опухолей у мышей, получавших липосомные формы ангиостатина (ТРО 67,0%) и эндостатина (ТРО 70,8%) по сравнению с мышами, которым вводили водные растворы белков (ТРО 26,1% и 34,6% соответственно) (рис. 18). Как видно из табл. 11, применение липосомных препаратов приводило и к существенному УСПЖ экспериментальных животных. Терапия липосомной формой ангиостатина приводила к двукратному УСПЖ по сравнению с терапией нелипосомным препаратом, а аналогичный показатель для липосомного эндостатина составил 1,9 раза.

Таблица 11. Эффективность противоопухолевого действия липосомных форм ангиостатина и эндостатина в отношении мышинной меланомы B16 *in vivo* в сравнении с нелипосомными формами.

Препарат		ОРО*, %	СПЖ, дни	УСПЖ, %
Контроль		100	29,1±2,9	–
Нелипосомные	Ангиостатин	73,9	35,1±2,7	20,6
	Эндостатин	65,4	36,3±3,0	24,7
Липосомные	Ангиостатин	33,0	41,3±3,3	41,9
	Эндостатин	29,2	42,9±2,9	47,4

\* Данные на 31-й день эксперимента

Сравнительное исследование противоопухолевой активности ангиостатина и эндостатина и их липосомных форм проводили на мышах с модельными солидными опухолями меланомы B16. Препараты ингибиторов ангиогенеза вводили животным внутривенно один раз в два дня, начиная с 10-го дня после прививки опухолевых клеток. Применение липосомных форм полипептидных препаратов позволяет увеличить время их полужизни в организме и

Нами также изучался противоопухолевый эффект липосомных форм ангиостатина и эндостатина при их комбинированном применении с ДР. Исследование показало, что введение обоих препаратов в режиме сочетанной терапии с антибиотиком приводило к значительному подавлению роста опухолей (на 70,5% при терапии липосомным ангиостатином и на 72,6% при терапии липосомным эндостатином) и увеличению СПЖ животных (50,9% и 55,0%, соответственно). При этом значения показателей ТРО и УСПЖ превышали таковые от терапии только липосомными препаратами (табл. 11 и 12). Таким образом, введение в терапевтическую схему ДР позволяет существенно повысить эффективность терапии липосомными антиангиогенными препаратами.

**Таблица 12. Эффективность противоопухолевого действия липосомных форм ангиостатина и эндостатина в отношении мышинной меланомы В16 *in vivo* при их сочетанном применении с ДР.**

Препарат		ОРО*, %	СПЖ, дни	УСПЖ, %
Контроль		100	29,1±2,9	–
ДР, 2 мг/кг	Липосомный ангиостатин	29,5	43,92±2,6	50,9
	Липосомный эндостатин	27,4	45,12±3,1	55,0

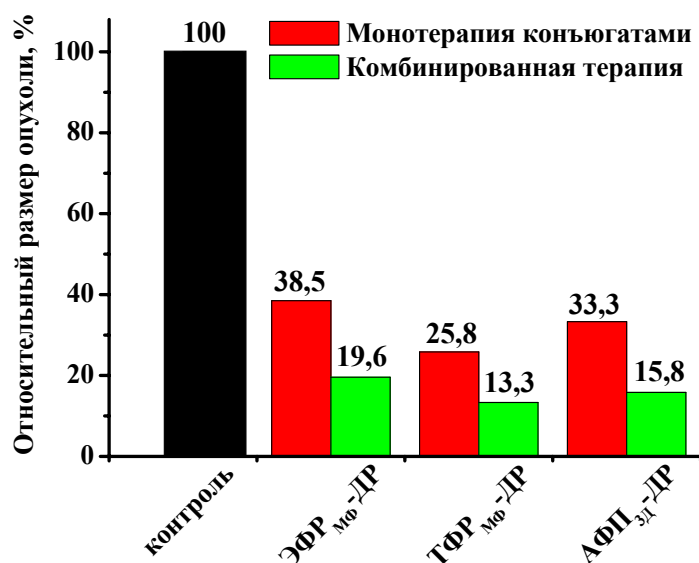
\* Данные на 31-й день эксперимента

### **Изучение возможностей совместного применения антиангиогенных препаратов и препаратов направленного действия на основе ДР и векторных пептидов для терапии опухолей**

Завершающей частью нашего исследования являлось выяснение возможных преимуществ комбинированной противоопухолевой терапии антиангиогенными полипептидами и цитотоксическими препаратами направленного действия на основе ДР. Согласно современным представлениям о химиотерапии опухолей, наибольшую эффективность лечения может обеспечить комбинированная химиотерапия препаратами с различным механизмом действия. В основе этого подхода лежит представление о том, что нарушение различных биохимических процессов в опухолевой клетке уменьшает шансы на то, что уцелеют резистентные клоны опухолевых клеток. Терапия антиангиогенными полипептидами, разрушающая инфильтрующие опухоль кровеносные сосуды и уничтожающая раковую клетку опосредованно, могла бы успешно сочетаться с применением высокоэффективных противоопухолевых антибиотиков, проявляющих в малигнизированных тканях прямое цитотоксическое действие. Продemonстрированное *in vivo* увеличение терапевтической эффективности ДР в составе препаратов направленного действия на основе ЭФР<sub>МФ</sub>, ТФР<sub>МФ</sub> и АФП<sub>ЗД</sub> по сравнению со свободным ДР позволило нам использовать эти препараты в схемах комбинированной терапии.

Исследование проводили на мышах с привитыми опухолями мышинной меланомы В16. При сочетании применения липосомной формы ангиостатина с препаратами направленного действия ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР и АФП<sub>ЗД</sub>-ДР

наблюдалось выраженное увеличение терапевтической эффективности всех исследуемых препаратов (рис. 19, табл. 13).



**Рис. 19.** Торможение опухолевого роста при комбинированной терапии экспериментальных животных липосомной формой ангиостатина и препаратами направленного действия на основе ДР (данные на 31 день эксперимента).

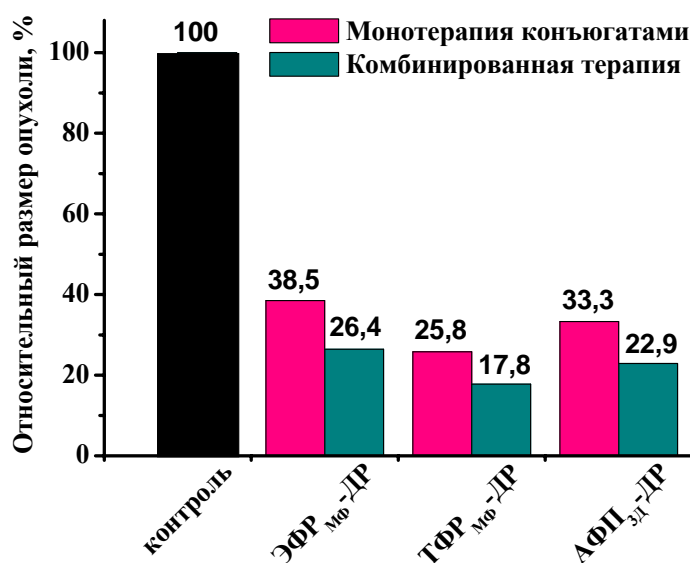
Как показано на рис. 19, при сочетании терапии препаратами ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР и АФП<sub>3д</sub>-ДР с введением липосомного ангиостатина во всех случаях отмечалось более выраженное торможение опухолевого роста, чем при монотерапии препаратами направленного действия. Комбинированная терапия препаратами направленного действия приводила также к увеличению СПЖ экспериментальных животных по сравнению с монотерапией (табл. 13). В случае сочетанного применения ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР и АФП<sub>3д</sub>-ДР и липосомной формы ангиостатина наблюдали достоверное УСПЖ, что свидетельствует о высокой терапевтической эффективности такой терапии.

**Таблица 13.** Увеличение средней продолжительности жизни мышей с привитыми опухолями при комбинированной терапии липосомной формой ангиостатина и препаратами направленного действия на основе ДР.

Препарат	Монотерапия		Комбинированная терапия	
	СПЖ, дни	УСПЖ, %	СПЖ, дни	УСПЖ, %
Контроль	33,4±2,0	–	33,4±2,0	–
ЭФР <sub>МФ</sub> -ДР	43,6±1,2	30,6	49,0±1,4	46,7
ТФР <sub>МФ</sub> -ДР	46,2±1,2	38,4	51,1±1,0	53,0
АФП <sub>3д</sub> -ДР	45,4±1,5	35,9	49,7±1,2	48,8



Похожие результаты наблюдались при комбинированной терапии мышей с меланомой В16 липосомной формой эндостатина и препаратами направленного действия на основе ДР и векторных пептидов (рис. 20 и табл. 14).



**Рис. 20.** Торможение опухолевого роста при комбинированной терапии экспериментальных животных липосомной формой эндостатина и препаратами направленного действия на основе ДР (данные на 31-й день эксперимента).

На рис. 20 представлены графические данные по торможению опухолевого роста при комбинированном применении препаратов направленного действия ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР и АФП<sub>ЗД</sub>-ДР и липосомного эндостатина. Как видно из приведенных данных, в случае сочетанной терапии наблюдалось выраженное увеличение терапевтической эффективности по сравнению с монотерапией только препаратами направленного действия.

**Таблица 14.** Увеличение средней продолжительности жизни мышей с привитыми опухолями при комбинированной терапии липосомной формой эндостатина и препаратами направленного действия на основе ДР.

Препарат	Монотерапия		Комбинированная терапия	
	СПЖ, дни	УСПЖ, %	СПЖ, дни	УСПЖ, %
Контроль	33,4±2,0	–	33,4±2,0	–
ЭФР <sub>МФ</sub> -ДР	43,6±1,2	30,6	48,3±1,6	44,6
ТФР <sub>МФ</sub> -ДР	46,2±1,2	38,4	49,8±1,3	49,1
АФП <sub>ЗД</sub> -ДР	45,4±1,5	35,9	49,6±1,4	48,5

Комбинированная терапия также приводила к увеличению СПЖ экспериментальных животных по сравнению с монотерапией (табл. 14). Как следует из представленных данных, терапевтический потенциал эндостатина довольно

значительно увеличивается при сочетанном его применении с препаратами ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР и АФП<sub>3д</sub>-ДР.

Представленные результаты свидетельствуют о высоком потенциале комбинированной антиангиогенно-цитотоксической противоопухолевой терапии. Как показали исследования, наибольшего терапевтического эффекта и увеличения продолжительности жизни у экспериментальных животных удаётся добиться при сочетанном применении препаратов направленного действия на основе ДР (ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР и АФП<sub>3д</sub>-ДР) и антиангиогенных полипептидов – ангиостатина и эндостатина.

## ВЫВОДЫ

1. Путем химического синтеза получены препараты направленного действия, включающие химиопрепараты (фталоцианины, хлорины, антрациклиновые антибиотики и растительные алкалоиды) и векторные белки (ЭФР и АФП), проявляющие цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток человека, превышающую активность соответствующих химиопрепаратов.
2. Показано преимущественное накопление антрациклинового антибиотика доксорубина в основных мишенях его цитотоксического действия – ядрах опухолевых клеток – при использовании его в составе препарата направленного действия на основе ЭФР. Обнаружено, что при поступлении доксорубина в опухолевые клетки в составе конъюгата с ЭФР уровень его содержания в клетках и ядрах, а также распределение между ядром и цитоплазмой практически не зависят от чувствительности клеток к антибиотику. Динамика и уровень накопления свободного доксорубина определяется уровнем резистентности опухолевых клеток.
3. Продемонстрировано значительное снижение резистентности опухолевых клеток к доксорубину *in vitro* при его применении в составе препарата направленного действия на основе ЭФР.
4. Показано, что при поступлении доксорубина как в чувствительные, так и резистентные к этому антибиотику опухолевые клетки в составе препарата направленного действия уровень его внутриклеточной деградации заметно снижается.
5. В экспериментах *in vivo* на мышах с привитыми солидными опухолями меланомы В16 продемонстрировано, что терапевтическое применение систем направленного действия, включающих фталоцианины, антрациклины и растительные алкалоиды, приводит к значительному ингибированию опухолевого роста и увеличению продолжительности жизни животных. Применение свободных препаратов в тех же дозах практически не оказывает влияния на эти параметры.
6. Доказана возможность практического использования рецепторопосредованного эндоцитоза в качестве эффективного механизма селективного концентрирования и

транспорта в клетку модуляторов клеточной активности и цитотоксических веществ, осуществляемого с помощью ЭФР и АФП.

7. Впервые получены синтетические пептиды – модифицированные фрагменты рецепторсвязывающих участков ЭФР и ТФР $\alpha$  человека – и продемонстрирована их способность к поступлению в клетки опухолей эпителиального и мезенхимального гистогенеза путём рецепторопосредованного эндоцитоза.
8. Получены конъюгаты доксорубина с ЭФР, ЭФР<sub>МФ</sub> и ТФР<sub>МФ</sub> и продемонстрирована их высокая цитотоксическая активность в отношении клеток раковых опухолей человека линий различных линий. С помощью флуоресцентной микроскопии продемонстрирована внутриклеточная локализация конъюгатов.
9. Получен конъюгат доксорубина с рекомбинантным пептидным фрагментом  $\alpha$ -фетопротейна человека (3-й домен  $\alpha$ -фетопротейна). Установлена специфическая цитотоксическая активность полученного препарата в отношении различных опухолевых клеточных линий.
10. В экспериментах *in vivo* на мышах с привитыми солидными опухолями продемонстрировано, что терапевтическое применение цитотоксических препаратов направленного действия АФП<sub>ЗД</sub>-ДР, ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР и ТФР<sub>МФ</sub>-ДР значительно подавляет развитие опухолей и увеличивает среднюю продолжительность жизни животных.
11. Сконструирован плазмидный вектор, позволяющий осуществлять эффективную индуцируемую экспрессию гена эндостатина человека в штамме-продуценте *E. coli*. Разработаны эффективные модифицированные методы выделения и ренатурации рекомбинантного эндостатина человека.
12. Получены липосомные формы ангиостатина и эндостатина человека на основе фосфатидилхолина и холестерина, проявляющие высокую противоопухолевую активность.
13. В экспериментах по терапии опухолей *in vivo* показано, что совместное введение липосомных форм ангиостатина или эндостатина и свободного доксорубина является более эффективным, чем применение этих агентов в режиме монотерапии.
14. В экспериментах *in vivo* показано значительное увеличение эффективности противоопухолевого действия антиангиогенных агентов (ангиостатин, эндостатин) и препаратов направленного действия (АФП<sub>ЗД</sub>-ДР, ЭФР<sub>МФ</sub>-ДР, ТФР<sub>МФ</sub>-ДР) при их комбинированном применении.

### **Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Severin S., Feldman N., Finakova G., Savitsky A., Myaghkikh I., Luzhkov Yu., Katukov V., Nakachian R., Severin E. Antitumoral effect of alpha-fetoprotein conjugates *in vivo*. // Abstracts of XXIV meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, California, USA. – 1996. – P.121.
2. Severin S.E., Moskaleva E.Yu., Posypanova G.A., Koromylova I.A., Shmyrev I.I., Krivonos A.V., Myagkikh I.V., Feldman N.B., Finakova G.V., Katukov V.Yu., Luzhkov Yu.M.,

- Nakachian R., Andreani J., Severin E.S. *In vivo* antitumor activity of cytotoxic drugs conjugated with human  $\alpha$ -fetoprotein. // *Tumor Targeting*. – 1996. – Vol. 2. – P. 299-306.
3. Moskaleva E.Yu., Feldman N.B., Finakova G.V., Shmyrev I.I., Posipanova G.A., Rodina A.V., Nakachian R., Katukov V.Yu. Targeted delivery of antitumor drugs based on oncofetal protein alpha-fetoprotein. // *Abstracts of 5<sup>th</sup> European Winter Oncology Conference, France*. – 1997. – P. 59.
  4. Posypanova G.A., Sotnichenko A.I., Shmyrev I.I., Moskaleva E.Yu., Feldman N.B., Finakova G.V., Katukov V.Yu., Luzhkov Yu.M., Severin E.S., Nakachian R., Andreani J. Targeted delivery of experamicine A1 by using oncofetal protein  $\alpha$ -fetoprotein. // *Abstracts of the European cancer conference ECCO 9, Hamburg*. – 1997. – P.389.
  5. Lutsenko S.V., Finakova G.V., Feldman N.B., Gumanov S.G., Korzhenevsky D.A., Gukasova N.V. and Severin S.E. The increase in selectivity of antitumor action of vinblastine and vincristine by targeted delivery of their EGF-conjugates to tumor cells. // *Abstracts of the International Conference New Anticancer Agents, Athens, Greece*. – 1997. – P. 56.
  6. Луценко С.В., Гукасова Н.В., Посыпанова Г.А., Гуманов С.Г., Фельдман Н.Б., Москалева Е.Ю., Северин Е.С., Северин С.Е., Скрябин К.Г. ЭФР как вектор для направленной доставки доxorубина (ДР) к клеткам опухолевых линий, резистентных к ДР. // *Материалы VIII конференции «Новые направления биотехнологии» РАН, Москва, Россия*. – 1997. – С. 35.
  7. Луценко С.В., Гуманов С.Г., Фельдман Н.Б., Посыпанова Г.А., Москалева Е.Ю., Северин С.Е., Северин Е.С., Скрябин К.Г. Накопление и внутриклеточная локализация доxorубина (ДР) при его направленном транспорте к опухолевым клеткам с помощью эпидермального фактора роста (ЭФР). // *Материалы VIII конференции «Новые направления биотехнологии» РАН, Москва, Россия*. – 1997. – С. 48.
  8. Lutsenko S.V., Gukasova N.V., Gumanov S.G., Posypanova G.A., Korzhenevsky D.A., Feldman N.B. and Severin S.E. Study of the cytotoxic activity of the epidermal growth factor-doxorubicin conjugate against human tumor cell cultures. // *Abstracts of the 15<sup>th</sup> meeting European association for cancer research (EACR XV), Stockholm, Sweden*. – 1998. – P. 72.
  9. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Gukasova N.V., Posypanova G.A., Gumanov S.G., K.G.Skryabin, Severin S.E. Toxicity of epidermal growth factor conjugate with doxorubicin against antibiotics-resistant tumor cell cultures. // *Abstracts of the Fourth European congress of pharmaceutical sciences, Milan, Italy*. – 1998. – P. 56.
  10. Луценко С.В., Финакова Г.В., Фельдман Н.Б., Гуманов С.Г., Родина А.В., Посыпанова Г.А., Гукасова Н.В., Корженевский Д.А., Катук В.Ю., Северин С.Е., Скрябин К.Г., Кирпичников М.П. Рецепторопосредованный токсический эффект конъюгата эпидермального фактора роста с доxorубином в отношении опухолевых клеток. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 1998. – № 1. – С. 21-25.
  11. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Финакова Г.В., Гуманов С.Г., Гукасова Н.В., Корженевский Д.А., Бобрускин А.И., Гельперина С.Э., Посыпанова Г.А., Катук В.Ю., Северин С.Е., Скрябин К.Г., Кирпичников М.П., Каля О.Л., Ворожцов Г.Н. Направленная доставка к клеткам - мишеням и цитотоксическая противоопухолевая активность окта-4,5-карбокситалозианина (терафтала). // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 1998. – № 1. – С. 34-37.
  12. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Посыпанова Г.А., Северин С.Е., Скрябин К.Г., Лукьянец Е.А., Ворожцов Г.Н., Северин Е.С. Изучение цитотоксической противоопухолевой активности конъюгатов фталоцианинов с эпидермальным фактором роста (ЭФР). // *Российский химический журнал (журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева)*. – 1998. – Т. XLII. – № 5. – С. 101-104.
  13. Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Финакова Г.В., Шмырев И.И., Посыпанова Г.А., Скрябин К.Г., Северин С.Е. Повышение противоопухолевой активности доxorубина за счет его адресной доставки к клеткам-мишеням с помощью белковых векторов. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 1999. – №1. – С. 44-48.

14. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Финакова Г.В., Посыпанова Г.А., Бобрускин А.И., Гельперина С.Э., Скрябин К.Г., Каляя О.Л., Ворожцов Г.Н., Северин С.Е. Направленный транспорт ФЦ(Со) к опухолевым клеткам-мишеням с помощью альфа-фетопротеина и эпидермального фактора роста. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 1999. – №1. – С. 40-44.
15. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Finakova G.V., Posypanova G.A., Severin S.E., Skryabin K.G., Kirpichnikov M.P., Lukyanets E.A., Vorozhtsov G.N. Targeting phthalocyanines to tumor cells using epidermal growth factor conjugates. // Tumor biology. – 1999. – Vol. 20 (4). – P. 218-224.
16. Северин С.Е., Посыпанова Г.А., Сотниченко А.И., Москалева Е.Ю., Фельдман Н.Б., Григорьев М.И., Северин Е.С., Петров Р.В. Противоопухолевая активность ковалентного конъюгата эндиинового антибиотика эсперамицина А1 с  $\alpha$ -фетопротеином человека. // Доклады Академии наук (биохимия, биофизика, молекулярная биология). – 1999. – Т. 366. – №4. – С. 561-564.
17. Sotnichenko A.I., Severin S.E., Posypanova G.A., Feldman N.B., Grigor'ev M.I., Severin E.S., Petrov R.V. Water-soluble 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin complex with human  $\alpha$ -fetoprotein: properties, toxicity in vivo and antitumor activity in vitro. // FEBS Letters. – 1999. – Vol. 450. – P. 49-51.
18. Lutsenko S.V., Gukasova N.V., Kiselev S.M., Severina M.E., Feldman N.B., Severin S.E. The cytotoxic effect of the alpha-fetoprotein- doxorubicin conjugate on human embrionic umbilical vein endothelial cells and tumor cells MCF-7. // Abstracts of 27<sup>th</sup> meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Kyoto, Japan. – 1999. – P. 35.
19. Жаров В.П., Коваленко Н.А., Фельдман Н.Б., Ермилов С.А., Астахов Д.В., Луценко С.В., Северин С.Е., Северин Е.С. Изучение влияния фотоиммунизации на рост опухоли (в экспериментах на животных). // Материалы Российской научно-технической конференции “Медико-технические технологии на страже здоровья”, Россия, Геленджик. – 1999. – С. 144-145.
20. Петров Р.В., Сотниченко А.И., Посыпанова Г.А., Москалева Е.Ю., Фельдман Н.Б., Григорьев М.И., Северин Е.С., Северин С.Е. Разработка конструкций для направленной доставки противолейкемических средств с помощью  $\alpha$ -фетопротеина человека. // Новости науки и техники, серия “Медицина” (Аллергия, астма и клиническая иммунология). – 1999. – С. 10-11.
21. Lutsenko S.V., Gukasova N.V., Kiselev S.V., Severina M.E., Feldman N.B., Severin S.E. The cytotoxic effect of the alpha-fetoprotein-doxorubicin conjugate on human embrionic umbilical vein endothelial cells and tumor cells MCF-7. // Tumor Biology. – 1999. – Vol. 20 (S2). – P. 67.
22. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Finakova G.V., Gukasova N.V., Petukhov S.P., Posypanova G.A., Skryabin K.G., Severin S.E. Study of antitumor activity of alpha-fetoprotein and epidermal growth factor conjugates in vitro and in vivo. // Tumor Biology. – 2000. – Vol. 21(6). – P. 367-374.
23. Гуманов С.Г., Гукасова Н.В., Родина А.В., Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Северин С.Е. Цитотоксическая активность, накопление и внутриклеточное распределение доксорубина и его конъюгата с эпидермальным фактором роста в чувствительных и резистентных к доксорубину опухолевых клетках. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2000. – №2. – С. 17-22.
24. Савицкий А.А., Гукасова Н.В., Гуманов С.Г., Фельдман Н.Б., Лукьянец Е.А., Миронов А.Ф., Якубовская Р.И., Луценко С.В., Северин С.Е. Цитотоксическое действие конъюгатов альфа-фетопротеина и эпидермального фактора роста с фотогомом, хлоринами и фталоцианинами. // Биохимия. – 2000. – Т. 65 (6). – С. 859-864.
25. Фельдман Н.Б., Киселев С.М., Гукасова Н.В., Посыпанова Г.А., Луценко С.В., Северин С.Е. Противоопухолевая активность конъюгата  $\alpha$ -фетопротеина с доксорубином in vitro и in vivo. // Биохимия. – 2000. – Т. 65 (8). – С. 1140-1145.

26. Сотниченко А.И., Заболотнев Д.В., Фельдман Н.Б., Северин С.Е., Северин Е.С., Петров Р.В. Разработка конструкций для направленной доставки противоопухолевых препаратов с помощью  $\alpha$ -фетопротеина человека. // *Материалы докладов III съезда иммунологов и аллергологов СНГ, Дагомыс, Россия.* – 2000. – С. 16.
27. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Гукасова Н.В., Посыпанова Г.А., Киселев С.М., Северин С.Е. Повышение терапевтической эффективности доxorубина при его адресном транспорте к опухоли-мишени с помощью альфа-фетопротеина. // *Биомедицинские технологии.* – 2000. – № 13. – С. 27-31.
28. Savitsky A.A., Gukasova N.V., Gumanov S.G., Feldman N.B., Luk'yanets E.A., Mironov A.F., Yakubovskaya R.I., Lutsenko S.V., Severin S.E. Cytotoxic action of conjugates of  $\alpha$ -fetoprotein and epidermal growth factor with photoheme, chlorines, and phthalocyanines. // *Biochemistry (Moscow).* – 2000. – Vol. 65 (6). – P. 732-736.
29. Feldman N.B., Kiselev S.M., Gukasova N.V., Posypanova G.A., Lutsenko S.V., Severin S.E. Antitumor activity of  $\alpha$ -fetoprotein conjugate with doxorubicin in vitro and in vivo. // *Biochemistry (Moscow).* – 2000. – Vol. 65 (8). – P. 967-971.
30. Луценко С.В., Киселев С.М., Гукасова Н.В., Посыпанова Г.А., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Эпидермальный фактор роста и его рецептор-связывающий фрагмент как векторы для направленной доставки доxorубина в опухолевые клетки. // *Биомедицинские технологии.* – 2000. – № 13. – С. 23-27.
31. Сотниченко А.И., Заболотнев Д.В., Фельдман Н.Б., Северин С.Е., Северин Е.С., Петров Р.В. Разработка конструкции для направленной доставки противоопухолевых препаратов с помощью  $\alpha$ -фетопротеина человека. // *Материалы отчетной конференции по Межведомственной научно-технической программе «Вакцины нового поколения и медицинские диагностические системы будущего», Москва, Россия.* – Аллергология и иммунология. – 2000. – Т.1. – №3. – С. 106.
32. Фельдман Н.Б., Киселев С.М., Гукасова Н.В., Посыпанова Г.А., Хомяков Ю.Н., Луценко С.В., Северин С.Е. Цитотоксическая и противоопухолевая активность конъюгата  $\alpha$ -фетопротеина с доxorубином. // *Материалы VII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, Россия.* – 2000. – С. 556.
33. Гуманов С.Г., Родина А.В., Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Северин С.Е. Цитотоксическая активность, накопление и внутриклеточное распределение доxorубина и его конъюгата с эпидермальным фактором роста. // *Материалы VII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 2000, с. 401.*
34. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Гукасова Н.В., Посыпанова Г.А., Киселев С.М., Северин С.Е. Использование белковых векторов для направленного транспорта доxorубина в опухолевые клетки-мишени. // *Материалы VII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, Россия.* – 2000. – С. 518.
35. Kiselev S.M., Gukasova N.V., Feldman N.B., Lutsenko S.V., Severin S.E. The use of protein vector  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) for targeted delivery of doxorubicin (DR) to endothelial and cancerous human cells. // *Abstracts of 17<sup>th</sup> Meeting of the International Academy of Tumour Marker Oncology, Hong Kong.* – *Journal of Tumour Marker Oncology.* – 2000. – Vol. 15 (1). – P. 37.
36. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Гуманов С.Г., Родина А.В., Северин С.Е. Цитотоксическая активность, накопление и внутриклеточное распределение антрациклиновых антибиотиков и их конъюгатов с ЭФР в чувствительных и резистентных клетках MCF-7. // *Биохимия.* – 2000. – Т. 65 (11). – С. 1538-1545.
37. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Gumanov S.G., Gukasova N.V., Severin S.E. Overcoming of vincristine resistance by conjugation with epidermal growth factor. // *Abstracts of 28<sup>th</sup> meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Munich, Germany.* – 2000. – P. 136.
38. Kiselev S.M., Gukasova N.V., Feldman N.B., Lutsenko S.V., Severin S.E. Cytotoxic activity of the conjugate of the epidermal growth factor with doxorubicin against human cells. // *Abstracts of 28<sup>th</sup> meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, Munich, Germany.* – 2000. – P. 137.

39. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Gumanov S.G., Rodina A.V., Severin S.E. Cytotoxic activity, accumulation, and intracellular distribution of anthracycline antibiotics and their conjugates with the epidermal growth factor in sensitive and resistant MCF-7 cells. // *Biochemistry (Moscow)*. – 2000. – Vol. 65 (11). – P. 1299-1304.
40. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Гуманов С.Г., Родина А.В., Северин С.Е. Цитотоксическая активность, накопление и внутриклеточное распределение конъюгата карминомицина с эпидермальным фактором роста. // *Биологические мембраны*. – 2001. – Т. 18. – № 2. – С. 125-130.
41. Feldman N.B., Lutsenko S.V., Belousova Yu.V., Voronin M.V., Severin S.E. Cytotoxic activity of conjugates of the doxorubicin with EGF and its receptor-binding fragment. // *Abstract of 3<sup>rd</sup> Central European Conference on Human Tumor Markers (CECHTUMA), Karlovy Vary, Czech Republic*. – Biomarkers and Environment. – 2001. – Vol. 4 (1,2). – P. 50.
42. Сотниченко А.И., Северин С.Е., Фельдман Н.Б., Заболотнев Д.В., Северин Е.С., Петров Р.В. Изучение противоопухолевой активности водорастворимого комплекса 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*p*-диоксина (ТХДД) с  $\alpha$ -фетопротеином человека *in vivo*. // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. – 2001. – №1. – С. 8-11.
43. Луценко С.В., Гукасова Н.В., Посыпанова Г.А., Ажаев А.В., Ажаева Е.В., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Увеличение цитотоксической активности доксорубина при его транспорте в опухолевые клетки с помощью белковых векторов. // *Российский онкологический журнал*. – 2001. – №3. – С. 33-37.
44. Feldman N.B., Lutsenko S.V., Severin S.E. The epidermal growth factor is a promising vehicle for drug delivery to tumor cells. // *Abstracts of 18<sup>th</sup> International conference on human tumor markers, Riga, Latvia*. – 2001. – P. 75.
45. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Kiselev S.M., Severin S.E. Antiangiogenic and antitumor effects of AFP and EGF conjugates with doxorubicin. // *Abstracts of 18<sup>th</sup> International conference on human tumor markers, Riga, Latvia*. – 2001. – P. 82.
46. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Gukasova N.V., Severin S.E. The epidermal growth factor is a promising vehicle for drug delivery to tumor cells. // *Abstracts of Asian-Pacific conference of tumor biology (APCTB 2001), Beijing, China*. – 2001. – P. 23.
47. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Kiselev S.M., Severin S.E. Combined therapy of solid murine melanoma B16 tumors with the AFP-DR conjugate and angiostatin. // *Abstracts of 29<sup>th</sup> meeting of the ISOBM, Barcelona, Spain*. – 2001. – P. 155.
48. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Гуманов С.Г., Северин С.Е. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности антибиотиков антрациклинового ряда. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2001. – №2. – С. 3-9.
49. Severin S.E., Feldman N.B., Lutsenko S.V. Cytotoxic and antitumor activities of doxorubicin conjugates with the epidermal growth factor and its receptor-binding fragment. // *Abstracts of 3<sup>rd</sup> international symposium on genetic anticancer agents, Amsterdam, The Netherlands*. – 2002. – P. 130.
50. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Glukhov A.I., Severin S.E. Cytotoxic activity of doxorubicin conjugated with the epidermal growth factor. *Abstracts of 17<sup>th</sup> International Symposium of the European Association for Cancer Research, Granada, Spain*. – 2002. – P. 154.
51. Sladkova L.V., Moskaleva E.Yu., Posypanova G.A., Feldman N.B., Severin S.E. Induction of apoptosis and regulation of BCL-2 and BCL XL expression in various human tumor B-cell lines. // *Abstracts of 17<sup>th</sup> International Symposium of the European Association for Cancer Research, Granada, Spain*. – 2002. – P. 90.
52. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Severin S.E. Cytotoxic and antitumor activities of doxorubicin conjugates with the epidermal growth factor and its receptor-binding fragment. // *Journal of Drug Targeting*. – 2002. – Vol. 10(7). – P. 567-571.
53. Lutsenko S.V., Kiselev S.M., Feldman N.B., Zabolotnev D.V., Severin S.E. Modified forms of the EGF receptor-binding fragment as an efficient vehicle for targeted drug delivery to tumor cells. // *Abstracts of 30<sup>th</sup> meeting of the ISOBM, Boston, USA*. – 2002. – P. 68.

54. Фельдман Н.Б., Посыпанова Г.А., Гельперина С.Э., Скидан И.Н., Хомяков Ю.Н., Луценко С.В., Северин С.Е. Адресная доставка биологически активных соединений в опухолевые клетки с помощью белковых и пептидных векторов. // Вестник НИИ молекулярной медицины. – 2002. – №2. – С. 38–54.
55. Луценко С.В., Захарова И.В., Кузина Н.В., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Комбинированная терапия опухолей с применением конъюгата альфа-фетопротеина с доксорубицином и ангиостатина. // Материалы X Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, Россия. – 2003. – С. 629.
56. Луценко С.В., Заболотнев Д.В., Фаттахова Г.В., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Противоопухолевые препараты направленного действия на основе пептидных векторов. // Материалы X Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, Россия. – 2003. – С. 628-629.
57. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Severin S.E. Influence of a type of a chemical bond on cytotoxic and antitumor activities of EGF–doxorubicin conjugates. // Abstracts of the 14<sup>th</sup> International Congress on Anti-Cancer Treatment, Paris, France. – 2003. – P. 62.
58. Feldman N., Lutsenko S., Severin S. The use of the alpha-fetoprotein–doxorubicin conjugate and angiostatin in combined therapy of tumors. // 37<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of European Society for Clinical Investigation (ESCI), Verona, Italy. – 2003. – P. 17.
59. Луценко С.В., Заболотнев Д.В., Фельдман Н.Б., Северин С.Е., Катлинский А.В., Северин Е.С., Пальцев М.А. Новые подходы к противоопухолевой терапии: применение препаратов направленного действия и антиангиогенных агентов. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2003. – №2. – С. 19-24.
60. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Severin S.E. Antitumor activity of doxorubicin conjugates with the epidermal growth factor and its receptor-binding fragment against murine melanoma. // Abstracts of 9th World Congress on Cancers of the Skin, Sevilla (Spain). – 2003. – P. 45.
61. Feldman N.B., Lutsenko S.V., Severin S.E. Therapy of solid murine melanoma B16 tumors with the AFP-DR conjugate and angiostatin. // Abstracts of 9th World Congress on Cancers of the Skin, Sevilla (Spain), 2003. – P. 46.
62. Луценко С.В., Гукасова Н.В., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Особенности создания лекарственных средств на основе белковых и пептидных векторов. // Вестник НИИ молекулярной медицины. – 2003. – №3. – С. 45–57.
63. Фельдман Н.Б., Аль-Названи Н., Дигтярь А.В., Захарова И.В., Киселев С.М., Луценко С.В., Северин С.Е. Избирательная доставка химиопрепаратов в опухолевые клетки с помощью пептидных векторов. // Материалы XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, Россия. – 2004. – С. 378-379.
64. Луценко С.В., Аль-Названи Н., Захарова И.В., Фельдман Н.Б., Макаров В.А., Северин С.Е. Рецептор  $\alpha$ -фетопротеина – мишень для векторной доставки антибиотиков в опухолевые клетки. // Материалы XI Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, Россия. – 2004. – С. 232.
65. Аль-Названи Н., Фельдман Н.Б., Дигтярь А.В., Макаров В.А., Гороховец Н.В., Фаттахова Г.В., Захарова И.В., Киселев С.М., Луценко С.В., Северин С.Е. Сравнительное исследование возможностей использования белковых векторов в составе противоопухолевых препаратов. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2004. – №3. – С. 6-10.
66. Москалева Е.Ю., Ницветов М.Б., Фельдман Н.Б., Кулаков В.Н., Сологуб В.К., Коромылова И.А., Караулов А.В., Северин С.Е., Северин Е.С. Рецептор АФП в опухолях – иммунохимическое выявление и исследование фармакокинетики АФП, меченого иодом-125. // Материалы Объединенного иммунологического форума, Екатеринбург, Россия. – 2004. – Russian J. Immunol. – Vol. 3(1). – P. 91.
67. Lutsenko S., Feldman N., Severin S. The cytotoxic activity of doxorubicin conjugates targeted to the EGF receptor. // Abstracts of 32<sup>th</sup> meeting of the ISOBM, Helsinki, Finland. – 2004. – P. 91.
68. Feldman N.B., Al-Nazwani N., Gorokhovetz N.V., Makarov V.A., Zakharova I.V., Digtyar A.V., Lutsenko S.V., Severin S.E. Doxorubicin conjugates targeted to the EGF receptor. //



- Abstracts of 18<sup>th</sup> Meeting of the European Association for Cancer Research, Innsbruck, Austria. – 2004. – P. 31.
69. Луценко С.В., Киселев С.М., Аль-Названи Н., Дигтярь А.В., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Получение протеолитических фрагментов плазминогена, проявляющих антиангиогенную активность. // Материалы 1-й международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», Москва, Россия. – 2004. – С. 115-116.
  70. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Severin S.E. The use of modified forms of the EGF receptor binding fragment for targeted drug delivery to cancer cells. // Abstracts of the World Conference on Dosing of Antiinfectives, Nurnberg, Germany. – 2004. – P. A126.
  71. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Перспективы противоопухолевой антиангиогенной терапии. // Молекулярная медицина. – 2004. – №4. – С. 13-24.
  72. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Молекулярные механизмы межклеточной коммуникации. // Введение в молекулярную медицину / Под ред. М.А.Пальцева. – М. – ОАО «Издательство «Медицина». – 2004. – С. 338-413.
  73. Луценко С.В., Киселев С.М., Фельдман Н.Б., Северин С.Е. Молекулярные механизмы ангиогенеза в физиологических и патологических процессах. // Введение в молекулярную медицину / Под ред. М.А.Пальцева. – М. – ОАО «Издательство «Медицина». – 2004. – С. 446-496.
  74. Луценко С.В., Аль-Названи Н., Фельдман Н.Б., Катлинский А.В., Северин С.Е., Северин Е.С., Пальцев М.А. Противоопухолевые препараты направленного действия на основе пептидных векторов. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2005. – №1. – С. 13-18.
  75. Луценко С.В., Каплун А.П., Красильникова В.В., Дигтярь А.В., Захарова И.В., Фельдман Н.Б., Швец В.И., Северин С.Е. Липосомная форма ангиостатина и ее применение для лечения онкологических заболеваний. // Материалы XII Российского национального конгресса «Человек и Лекарство», Москва, Россия. – 2005. – С. 678.
  76. Дигтярь А.В., Посыпанова Г.А., Попова О.Н., Макаров В.А., Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Швец В.И. Исследование возможности применения пептидных векторов для адресной доставки биологически активных соединений в опухолевые клетки эпителиального происхождения. // Материалы XII Российского национального конгресса «Человек и Лекарство», Москва, Россия. – 2005. – С. 658.
  77. Дигтярь А.В., Киселёв С.М., Луценко Е.В., Захарова И.В., Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Северин С.Е. Лиганды рецептора эпидермального фактора роста в составе противоопухолевых препаратов направленного действия. // Материалы международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация», Пущино, Россия. – 2005. – С. 5-8.
  78. Дигтярь А.В., Луценко Е.В., Фельдман Н.Б., Киселёв С.М., Грицкова И.А., Луценко С.В., Северин С.Е. Антиангиогенная терапия с использованием нанотехнологий. // Материалы II Международной конференции «Молекулярная Медицина и Биобезопасность», Москва, Россия. – 2005. – С. 119-120.
  79. Киселёв С.М., Дигтярь А.В., Луценко Е.В., Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Северин С.Е. Новые противоопухолевые биопрепараты, сочетающие цитотоксические и антиангиогенные свойства. // Материалы II Международной конференции «Молекулярная Медицина и Биобезопасность», Москва, Россия. – 2005. – С.155.
  80. Дигтярь А.В., Киселёв С.М., Макаров В.А., Луценко Е.В., Попова О.Н., Фельдман Н.Б., Посыпанова Г.А., Луценко С.В., Северин С.Е. Фрагменты рецепторсвязывающих участков ЭФР и ТФР- $\alpha$  человека – эффективные векторы для создания противоопухолевых препаратов с избирательным действием. // Вестник НИИ молекулярной медицины ММА им. И.М. Сеченова. – 2005. – №5. – С. 51-61.
  81. Дигтярь А.В., Луценко Е.В., Киселёв С.М., Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Северин С.Е. Повышение терапевтической эффективности ангиостатина путём конъюгирования с противоопухолевым антибиотиком. // Материалы заочной международной конференции «Приоритеты фармацевтической науки и практики». – 2006. – С. 343-345.

82. Калинина Е.С., Позднякова Н.В., Корженевский Д.А., Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Швец В.И. Выделение и изучение биологических свойств рекомбинантного человеческого эндостатина. // Вестник МИТХТ. – 2006. – №1. – С. 23-26.
83. Lutsenko S.V., Feldman N.B., Pozdnyakova N.V., Digtyar A.V., Lutsenko E.V., Kaplun A.P., Severin S.E., Shvets V.I. Inhibition of melanoma B16 growth in mice by liposomal forms of angiostatin and endostatin. // Abstracts of 19th Meeting of the European Association for Cancer Research, Budapest, Hungary. – 2006. – P. 176.
84. Feldman N.B., Digtyar A.V., Lutsenko S.V., Severin S.E. New EGF- and TGF $\alpha$ -derived small peptide carriers for targeted delivery of antitumor drugs to human prostate carcinoma cells. // Abstracts of 19th Meeting of the European Association for Cancer Research, Budapest, Hungary. – 2006. – P. 75.
85. Фельдман Н.Б., Позднякова Н.В., Николаенко Т.В., Дигтярь А.В., Кривошеева О.С., Луценко Е.В., Грицкова И.А., Луценко С.В., Северин С.Е., Швец В.И. Полимерные мицеллы на основе поли-N-винилпирролидона как эффективные средства доставки противоопухолевых антиангиогенных препаратов. // Молекулярная медицина. – 2006. – №4. – С. 33-37.

### *Патенты, оформленные по материалам диссертации*

86. Лужков Ю.М., Москалева Е.Ю., Накашьян Р., Посыпанова Г.А., Родина А.В., Северин С.Е., Фельдман Н.Б., Финакова Г.В., Шмырев И.И. Конъюгаты биологически активных веществ с альфа-фетопротеем, обладающие избирательным действием по отношению к раковым опухолям, способ их получения (варианты) и фармацевтическая композиция на их основе. Патент РФ №2071351 от 23.07.1996.
87. Киселев С.М., Луценко С.В., Северин Е.С., Северин С.Е., Фельдман Н.Б. Полипептид, являющийся аналогом рецепторсвязывающего фрагмента эпидермального фактора роста с 21 по 31 аминокислоту, его конъюгат с доксорубицином и фармацевтическая композиция на его основе. Патент РФ №2196604 от 21.12.2001.
88. Гороховец Н.В., Дигтярь А.В., Корженевский Д.А., Луценко Е.В., Луценко С.В., Макаров В.А., Позднякова Н.В., Северин Е.С., Северин С.Е., Соловьев А.И., Фельдман Н.Б. Препарат человеческого эндостатина и способ его получения. Патент РФ №2278688 от 2.12.2004.
89. Захарова И.В., Киселев С.М., Луценко Е.В., Луценко С.В., Макаров В.А., Северин Е.С., Северин С.Е., Фельдман Н.Б. Векторный полипептид – аналог фрагмента трансформирующего фактора роста альфа (ТФР $\alpha$ ), его противоопухолевый конъюгат и фармацевтическая композиция на основе конъюгата. Заявка на выдачу патента РФ №2004135223 от 2.12.2004.
90. Быков В.А., Безруков Д.А., Дигтярь А.В., Каплун А.П., Красильникова В.В., Луценко Е.В., Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Швец В.И. Ингибитор ангиогенеза, антиангиогенная фармацевтическая композиция на его основе и способ лечения злокачественных новообразований. Патент РФ №2287341 от 1.03.2005.
91. Гороховец Н.В., Дигтярь А.В., Луценко Е.В., Луценко С.В., Макаров В.А., Посыпанова Г.А., Северин Е.С., Северин С.Е., Фельдман Н.Б. Противоопухолевый пептидный препарат на основе фрагмента альфа-фетопротееина, его конъюгат, фармацевтическая композиция и способ лечения гормонзависимых опухолей. Заявка на выдачу патента РФ №2005109541 от 5.04.2005, решение о выдаче от 3.05.2006.