

ISSN 1726-9784

РОССИЙСКИЙ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

№2 Том 7 2008 г.

УДК 616-085.2/.3

Учредители

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Главный редактор

А.Ю. Барышников, д-р мед. наук, проф.

Заместители главного редактора

А.В. Караулов, чл.-корр. РАМН, Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф.

Редколлегия

М.А. Барышникова (отв. секретарь), Н.А. Батуринская, О.А. Бочарова, д-р биол. наук, проф. (Москва),
А.К. Голенков, д-р мед. наук, проф. (Москва), Л.В. Демидов, д-р мед. наук, проф. (Москва),
И.В. Евсегнеева, д-р. мед. наук, проф. (Москва), П.К. Иванов, д-р мед. наук (Москва),
З.Г. Кадагидзе, д-р мед. наук, проф. (Москва), И.Ю. Кубасова, канд. мед. наук (Москва),
В.М. Моисеенко, д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург), В.В. Новиков, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород),
Н.С. Сергеева, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.В. Степанова, канд. мед. наук (Москва),
Н.Н. Тупицын, д-р мед. наук, проф. (Москва), Е.Г. Турнянская, канд. мед. наук (Москва),
С.А. Тюляндин, д-р мед. наук, проф. (Москва), Ю.В. Шишкин, д-р мед. наук, проф. (Москва),
И.Ж. Шубина, канд. биол. наук (Москва), Р.И. Якубовская, д-р мед. наук, проф. (Москва)

Редакционный совет

А.П. Арзамасцев, академик РАМН, д-р фарм. наук, проф. (Москва),
Н.П. Бочков, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва), А.М. Гарин, д-р мед. наук, проф. (Москва),
Г.П. Георгиев, академик РАН, д-р биол. наук, проф. (Москва),
М.Л. Гершанович, д-р мед. наук, проф. (Санкт-Петербург),
М.И. Давыдов, академик РАН и РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва),
М.Р. Личиницер, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф. (Москва),
В.А. Тутьян, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва),
В.И. Чиссов, академик РАМН, д-р мед. наук, проф. (Москва)

«Российский биотерапевтический журнал» является рецензируемым изданием

Подписной индекс 81679

Зарегистрировано в Государственном Комитете Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций

Регистрационный номер:

ПИ №77-11695 от 21.01.2002 г.

Почтовый адрес:

115478 Москва, Каширское ш., 24
НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН
Тел.: 323 57 00, 324 10 65; факс: 324 22 74;
E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
Интернет-версия: www.rosoncoveb.ru/rbj/

Издательская группа РОНЦ:

115478 Москва, Каширское шоссе, д. 24.
Тел. (495) 324 24 70; publisher1@cancercenter.ru

Объем 8 усл. печ. листов,
подписано в печать 18.02.2008

4-ая Международная конференция "Постгеномные технологии разработки противоопухолевых агентов с новыми механизмами действия"

Московская обл., г. Химки, Центр высоких технологий "ХИМРАР"
3 декабря 2007 г.

Информационные партнеры:



Содержание:

1. Научные итоги международной конференции	
К.В. Балакин, А.А. Иващенко «Постгеномные технологии разработки противоопухолевых агентов с новыми механизмами действия».....	4
2. Научная программа	
2.1. Пленарная сессия.....	16
2.2. Сессия №1. <i>Инновационные противоопухолевые агенты</i>	23
2.3. Сессия №2. <i>Новые биомишени для действия противоопухолевых препаратов и тест-системы биологических испытаний</i>	34
2.4. Сессия №3. <i>Поиск противоопухолевых препаратов на основе новых технологий генерации знаний</i>	49
3. Стендовая сессия.....	58

К.В. Балакин, А.В. Иващенко

ПОСТГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ РАЗРАБОТКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ С НОВЫМИ МЕХАНИЗМАМИ ДЕЙСТВИЯ

Центр Высоких Технологий ХимРар, г. Химки, Московская обл.,
тел.: +7 (495) 995-4941, e-mail: chemrar@chemrar.ru

Традиционно в самом начале декабря на базе Центра Высоких Технологий ХимРар в подмосковных Химках проводятся научные конференции, посвященные различным аспектам разработки инновационных лекарств. Темой четвертых по счету «декабрьских чтений», состоявшихся 03 декабря 2007 года, стали передовые технологии создания противоопухолевых лекарств нового поколения. В настоящей статье представлен краткий анализ основных научных итогов состоявшегося форума.

Общая информация

Международная конференция «Постгеномные технологии разработки противоопухолевых агентов с новыми механизмами действия» состоялась 03 декабря 2007 года на базе негосударственного Исследовательского Института Химического Разнообразия (ИИХР) в Центре Высоких Технологий (ЦВТ) ХимРар (Химки, Московская область). Однодневный форум собрал более 60 отечественных специалистов, а также ряд зарубежных исследователей, работающих в области изучения механизмов возникновения и развития опухолевых заболеваний и создания лекарственных средств для их лечения. Был освещен целый ряд перспективных подходов к решению этой задачи, связанных с достижениями «постгеномной эры». Основная идея этих подходов состоит в широком использовании информации, полученной в геномных и протеомных исследованиях. Эти данные применяются для поиска новых синтетических молекул, модулирующих активность белковых биомишеней, вовлеченных в развитие опухолевых патологий.

На конференции были представлены доклады зарубежных ученых, а также ведущих отечественных специалистов. В рамках пленарной сессии состоялись два доклада от видных зарубежных исследователей – Яна Лавровского, руководителя исследовательских программ компании ChemDiv, Inc. (США), и Стефана Краусса, главы Биомедицинского Инновационного Центра при Университете Осло (Норвегия). Другие доклады были представлены в рамках трех рабочих сессий: «Инновационные противоопухолевые агенты», «Новые биомишени для действия противоопухолевых препаратов» и «Поиск противоопухолевых лекарств на основе новых технологий генерации знаний». Выступили ведущие ученые из Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина, МГУ им. М.В. Ломоносова, Института биоорганиче-

ской химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Института физиологии им. И.П. Павлова, ЦВТ ХимРар и ряда других российских исследовательских институтов и фармацевтических корпораций.

Необходимо сказать несколько слов о месте проведения конференции. ЦВТ ХимРар – это уникальный для Российской Федерации научно-исследовательский комплекс, объединяющий инновационные высокотехнологичные компании, занятые разработкой и выводением на рынок лекарственных препаратов нового поколения. ЦВТ ХимРар оказывает полный комплекс услуг для крупнейших отечественных и международных фармацевтических компаний, связанных с доклинической и клинической разработкой инновационных лекарств. Организации ЦВТ осуществляют как сервисные модели развития бизнеса, оказывая различные заказные научные исследования для зарубежных и отечественных фармпроизводителей, так и инициативные разработки. После прохождения этапа технологизации новых знаний наиболее успешные проекты зачастую выделяются в самостоятельные предприятия, осуществляющие дальнейшую коммерциализацию разработок. В последние годы ЦВТ ХимРар все чаще ассоциируется с проведением представительных международных научных конференций. Начиная с 2004 года здесь был проведен целый ряд международных конгрессов, на которых обсуждались проблемы создания новых таргетных лекарств, исследования молекулярных биомишеней, организации кооперации исследовательских организаций, коммерциализации научных разработок, а также другие актуальные вопросы. Традиционными стали ежегодные «декабрьские чтения», и нынешняя конференция, темой которой стали передовые технологии разработки противоопухолевых лекарств нового поколения, оказалась уже четвертой по счету.

Разработка новых противоопухолевых лекарств: экономический аспект

Прежде чем перейти к обсуждению основных научных итогов конференции, необходимо, на наш взгляд, кратко затронуть экономический аспект разработки новых противоопухолевых препаратов. Фармацевтика является одной из самых рентабельных и доходных отраслей мировой экономики, демонстрирующей высокие темпы роста. По данным аналитической организации IMS Health, в 2008 году прогнозируется 6%-ный рост мирового фармацевтического рынка по сравнению с 2007 г. Предположительно, общее количество продаж на мировом фармацевтическом рынке за 2008 год составит \$735-745 млрд. В общей структуре рынка существенную долю занимают лекарства, призванные на борьбу с многочисленными опухолевыми патологиями, которые вносят наибольший вклад в смертность населения как в России, так и во всем мире. Имеющиеся в распоряжении врачей препараты часто недостаточно эффективны, обладают опасными побочными действиями или оказываются недоступными для пациентов в силу высокой стоимости. Для многих видов опухолей до сих пор вообще не существует эффективных средств терапевтического воздействия. Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (Food and Drug Administration, FDA) составило в конце 2007 года список препаратов, перешедших в 2007 году в клинические исследования. Противоопухолевые соединения являются безусловными лидерами в этом списке, насчитывая 88 из 253 препаратов (табл. 1). Для сравнения, занимающие второе место противовирусные лекарства и вакцины представлены вдвое меньшим числом препаратов.

Таблица 1

Области терапевтического применения препаратов, перешедших в 2007 г. в клинические испытания. Данные Управления по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA)

Терапевтическая область	Число препаратов
Онкология	88
Антивирусные препараты и вакцины	44
Заболевания ЦНС	41
Сердечно-сосудистые заболевания	26
Органы пищеварения и метаболизм	23
Респираторные заболевания	9
Офтальмология	8
Дерматологические	6
Заболевания опорно-двигательного аппарата	6
Другие	6

Противоопухолевые препараты чрезвычайно востребованы в Российской Федерации. В соответствии с прогнозом международного аналитического агентства ВМІ, объем рынка онкологических препаратов в структуре рецептурных лекарств в Российской Федерации будет неуклонно повышаться (рис. 1). Необходимо отметить, что доля рецептурных лекарств составила в 2006 году 60% от общей доли лекарств на рынке. Онкологические препараты входят в высшую ценовую категорию на отечественном фармацевтическом рынке. Не случайно, например, что, занимая лишь 4,5% российского рынка (в стоимостном выражении), именно онкологические препараты являются лидером по продажам в структуре продаж в государственной системе дополнительного лекарственного обеспечения (ДЛО) (данные аналитического агентства DSM Group). Доля онкологических препаратов в этом сегменте выросла с 25% в 2006 году до 35,6% в 2007 году. Более того, на рынке ДЛО абсолютным лидером по продажам является противоопухолевый препарат *Гливек*, средство для лечения миелоидной лейкемии.

Представленные данные свидетельствуют о том, что успешная реализация масштабных проектов по созданию инновационных противоопухолевых лекарств не только позволит сохранить здоровье и жизнь миллионам пациентов, но также способна приносить значительную экономическую отдачу. Защищенный патентами, лицензиями и авторскими правами инновационный лекарственный препарат в состоянии обеспечить стабильную прибыль, снижение конкурентных рисков и послужить отправной точкой для дальнейшего развития компании или института-разработчика. Задача последних состоит в привлечении современных научно-исследовательских технологий для наиболее эффективной реализации масштабных проектов по разработке лекарственных субстан-

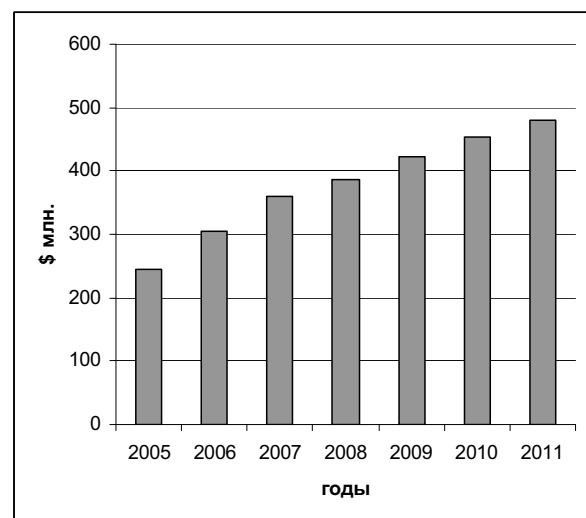


Рис. 1. Прогноз роста суммарного объема рынка онкологических препаратов в структуре рецептурных лекарств в Российской Федерации. Данные агентства ВМІ, 2007 г.

ций. Важно отметить, что после десятилетий застоя в создании новых лекарств отечественные разработчики постепенно выходят на современный уровень исследований, что уже в настоящее время приносит многообещающие результаты.

По нашему мнению, сегодня в Российской экономике, по крайней мере в ее фармацевтическом и биотехнологическом секторах, наступает некоторый переломный момент, когда происходит интенсивное освоение новых технологий исследований, а рыночные институты позволяют привлекать инвестиции в область разработки новых препаратов. Успех придет к тем компаниям и институтам, которые смогут умело «оседлать» эти ключевые факторы. Результаты состоявшейся конференции наглядно демонстрируют, что научное сообщество готово внести свой существенный вклад в решение общей задачи инновационного развития отечественной фармацевтической индустрии.

Материал статьи далее структурирован в соответствии с темами и содержанием тематических рабочих сессий, состоявшихся в рамках научной программы конференции.

Пленарные доклады: слово зарубежным коллегам



В рамках пленарной сессии состоялись два доклада от известных зарубежных исследователей, работающих в области молекулярной биологии рака. Я. В. Лавровский, руководитель исследовательских программ компании ChemDiv, Inc. (США), представил

доклад на тему «Разработки противоопухолевых лекарств на основе новейших биомиметов». Докладчик обсуждал результаты масштабных исследований по не-

скольким направлениям создания новых противоопухолевых агентов на основе «постгеномных» технологий, проведенных компанией ChemDiv совместно со своими партнерами в 2005-2007 годах. Базовой стратегией исследований явилось создание таргетных низкомолекулярных препаратов, воздействующих на определенные биомимети в организме человека, функционирование которых связано с возникновением и развитием опухолей. В частности, речь идет о нескольких типах соединений: ингибиторы активности хемокинового рецептора CXCR4, антиангиогенные агенты – ингибиторы сигнального каскада VEGF/VEGFR, ингибиторы внутриклеточных каскадов эмбрионального развития HedgeHog и Wnt. В ходе работ по этим направлениям было создано несколько перспективных низкомолекулярных агентов для лечения широкого круга раковых патологий, например, рака простаты, поджелудочной железы, прямой кишки и др. Также была разработана новая технология с использованием специальных биodeградируемых полимеров, позволяющая улучшать фармакологические свойства противоопухолевых препаратов. По каждому из указанных направлений исследований в настоящее время проводятся завершающие доклинические исследования, которые, в случае успешности, уже в 2008 г позволят начать клинические испытания.

Рамки небольшой статьи не позволяют детально описать все представленные проекты. Поэтому ограничимся одним примером. Компанией ChemDiv совместно с российскими коллегами из ЦБТ ХимПар была разработана новая технология с использованием специальных биodeградируемых полимеров, позволяющая улучшать фармакологические свойства противоопухолевых препаратов. Так, на основе известного лекарства ТаксолTM был создан инновационный препарат Нанотаксол, обладающий пониженной токсичностью и улучшенными фармакокинетическими свойствами. В экспериментах на мышах с привитыми опухолями человека было показано, что Нанотаксол существенно эффективнее исходного препарата в способности к продлению периода выживаемости (рис. 2).

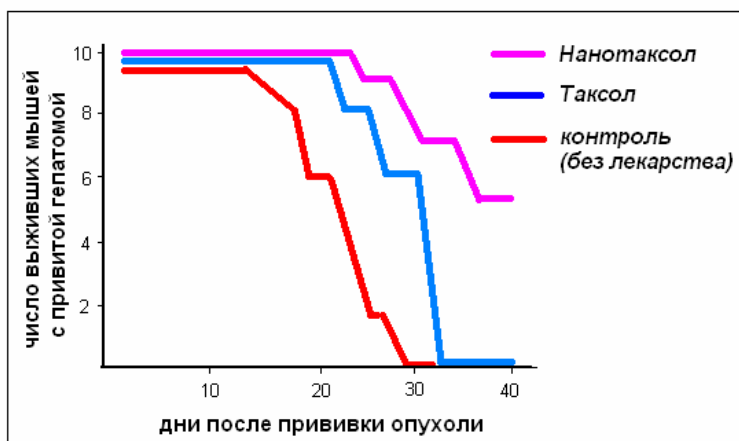
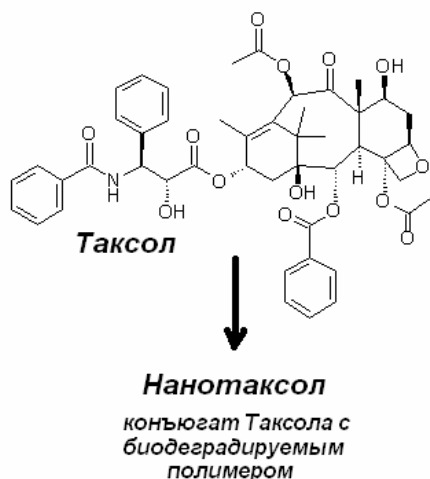


Рис. 2. Нанотаксол обладает улучшенными фармакологическими свойствами по сравнению с исходным препаратом

Данная технология было апробирована и на других препаратах, в том числе на антибиотиках и анальгетиках. Ее использование позволяет создавать целый класс новых лекарств, используя в качестве основы проверенные препараты.

Стефан Краусс, глава Биомедицинского Инновационного Центра при



Университете Осло (Норвегия), осветил некоторые важнейшие аспекты сигнальных клеточных каскадов Hh и Wnt. Эти каскады эмбрионального развития определяют процессы роста и дифференциации

нормальных и ряда опухолевых клеток (Taipale & Beachy 2001). В последние годы было выяснено, что Hh и Wnt каскады являются потенциальными фармакологическими биомаркерами, а их ингибиторы – перспективными терапевтическими средствами для лечения некоторых видов рака, включая базально-клеточную карциному, рак поджелудочной железы, рак прямой кишки (Kiselyov et al. 2007). В таблице 2 представлены актуальные данные по модуляторам активности Hh и Wnt каскадов, вошедшим в клиниче-

скую или доклиническую фазу исследований. В докладе был дан краткий обзор принципов функционирования Hh и Wnt сигнальных каскадов в процессах эмбрионального развития, роста стволовых и опухолевых клеток. Были также представлены данные биологических испытаний новых соединений, способных ингибировать эти каскады.

Инновационные противоопухолевые агенты

В рамках первой рабочей сессии были представлены четыре доклада, посвященных новым разработкам отечественных исследователей в области создания средств химической терапии опухолей.



Доклад А.А. Штиля, доктора медицинских наук, заведующего лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза ГУ Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина РАМН, назывался «Оликомицин А – мощный противоопухолевый антибиотик. Механизмы цито-

Таблица 2

Модуляторы активности Hh и Wnt каскадов, вошедшие в клиническую или доклиническую фазу исследований

Название	Механизм действия	Фаза испытаний	Разработчик	Терапевтическая область
CUR-61414 (G-024856)	антагонист <i>Smo</i> рецептора, ингибитор <i>Hh</i> каскада	фаза I клинических испытаний	Roche, Curis, Genentech	Базально-клеточная карцинома
Cyclopamine	антагонист <i>Smo</i> рецептора, ингибитор <i>Hh</i> каскада	доклинические	Johns Hopkins University, Howard Hughes Medical Institute, Curis	рак
<i>Hh</i> -Ag 1.2	агонист <i>Smo</i> рецептора, активатор <i>Hh</i> каскада	доклинические	Curis, Elan	болезнь Паркинсона
SAG 1.1	агонист <i>Smo</i> рецептора, активатор <i>Hh</i> каскада	доклинические	Curis, Johns Hopkins University	Нейрологические заболевания
CUR-691	антагонист <i>Smo</i> рецептора, ингибитор <i>Hh</i> каскада	доклинические	Curis, Genentech	Нейрологический рак
IPI-609	ингибитор <i>Hh</i> каскада	доклинические	Infinity Pharmaceuticals	рак
SDX-308 (CEP-18082)	ингибитор <i>Wnt</i> каскада, ингибитор β -катенина	доклинические	Salmedix	рак
SDX-309	ингибитор <i>Wnt</i> каскада, ингибитор β -катенина	доклинические	Salmedix	рак
SDX-328	ингибитор <i>Wnt</i> каскада, ингибитор β -катенина	доклинические	Salmedix	рак
ICG-001	ингибитор <i>Wnt</i> каскада, ингибитор фактора CBP	доклинические	Institute for Chemical Genomics, Choonqwa	рак прямой кишки
PRLX-8025	ингибитор <i>Wnt</i> каскада, ингибитор β -катенина	доклинические	Prolexys	рак прямой кишки

токсичности и оптимизация структуры». Оливомицин А (рис. 3), производное ауреоловой кислоты (см., например, Simonova et al. 2005), является мощным индуктором апоптоза, вызывая в концентрации всего 50 нМ гибель 50% клеток линий рака толстой кишки, молочной железы, меланомы и лейкоза человека в течение 24 часов. Соединение образует комплексы с узкой бороздкой ДНК в GC-богатых областях. Следовательно, цитотоксичность Оливомицина А может быть вызвана повреждением структуры дуплекса; последствиями этого будут, в частности, нарушения матричного синтеза. Действительно, в соответствии с экспериментальными данными, Оливомицин А является ингибитором транскрипции, причем сегрегация ядрышка (признак блокирования транскрипции, обусловленной РНК-полимеразой I) проявляется в первые минуты воздействия низких концентраций (12,5 нМ) препарата. Микрочип-анализ геной экспрессии выявил снижение мРНК ~ 50% генов. Наибольшее подавление экспрессии было отмечено для генов, продукты которых важны для выживания клеток: субъединица VI цитохромоксидазы и протимозин-альфа (снижение соответственно в 10 и 8 раз через 3 часа обработки клеток 100 нМ Оливомицина А). В низких концентрациях (<25 нМ) препарат вызывал активацию р53-зависимой транскрипции гена-репортера, а в более высоких – блокировал р53-зависимую транскрипцию (базальную и индуцируемую противоопухолевыми препаратами). В относительно высоких концентрациях (500 нМ) Оливомицин А снижал репликацию ДНК в клетках. Ингибирование матричных синтезов может быть обусловлено подавлением активности топоизомеразы I (ИК₅₀ ~ 25 нМ). В докладе были также представлены результаты химической оптимизации Оливомицина А с целью создания соединений с выраженной противоопухолевой активностью и лучшим терапевтическим индексом, чем у исходного антибиотика. В частности, производное ЛХТА-1297 проявило цитотоксичность в культурах опухолевых клеток и противоопухолевую активность у животных с перививным лейкозом Р388. В настоящее время проводится углубленное доклиническое исследование этого модифицированного антибиотика.

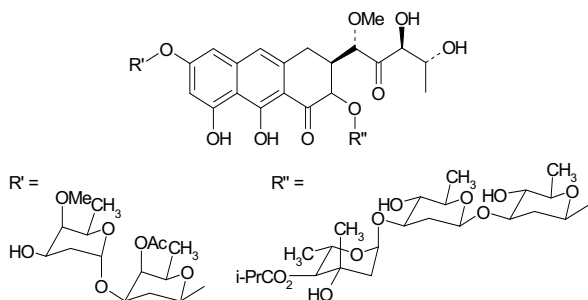


Рис. 3. Противоопухолевый антибиотик Оливомицин А

В докладе кандидата химических наук С.А. Лака-тоша, старшего научного сотрудника лаборатории химической трансформации антибиотиков ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе РАМН, были представлены сведения о создании новых ингибиторов протеинкиназ для преодоления лекарственной устойчивости инфекций и злокачественных опухолей. Серин-треониновые и тирозиновые протеинкиназы – ферменты, участвующие в передаче сигналов от клеточной мембраны к ядру и аппарату геной транскрипции, играют ключевую роль в развитии основных заболеваний человека, включая диабет, шизофрению, сердечно-сосудистые расстройства, различные виды опухолей, нарушения иммунитета (Cohen 2005). Эти киназы также обеспечивают образование бактериальных биопленок и поддержание толерантности и персистирования сложных популяций микроорганизмов. Докладчик представил новые методы синтеза ингибиторов протеинкиназ нового типа – аналогов известных ингибиторов класса бис(индол-3-ил)малеимидов. Скрининг на панели из 24-х протеинкиназ, относящихся как к серин-треониновым, так и к тирозиновым протеинкиназам, а также на изоформах протеинкиназы C (Cα, Cβ, Cγ) и РКС-подобных серин-треониновых протеинкиназах бактерий, привел к отбору ряда перспективных соединений. В продолжающихся в настоящее время исследованиях отобранные вещества будут использованы как основа для создания малотоксичных и высокоселективных ингибиторов киназ для лечения опухолей человека и преодоления устойчивости бактерий к антибиотикам.



Е.Л. Водовозова, доктор биологических наук, заместитель заведующего лабораторией химии липидов ИБХ РАН, представила сообщение на тему разработки и применения липидных производных химиотерапевтических средств в липосомальных формах.

Включение противоопухолевых препаратов в состав носителей-наночастиц, в том числе липосом, позволяет уменьшить общую токсичность и повысить эффективность лечения за счет уменьшения концентрации свободного лекарства в кровотоке и явления пассивного транспорта носителей в опухоли. В свою очередь, биodeградируемые липидные производные лекарств (липофильные пролекарства) обладают улучшенной фармакокинетикой. В ИБХ РАН были разработаны синтезы пролекарств широко применяемых в клинике препаратов с целью включения их в липидный бислой липосом (рис. 4). Доставка лекарств в опухолевые клетки в виде липофильных пролекарств в мембране липосом дает ряд преимуществ по сравнению с инкапсулированием во внутренний водный объем носителя. В частности, уменьшается утечка препарата в процессе циркуляции липосом в кровотоке и при

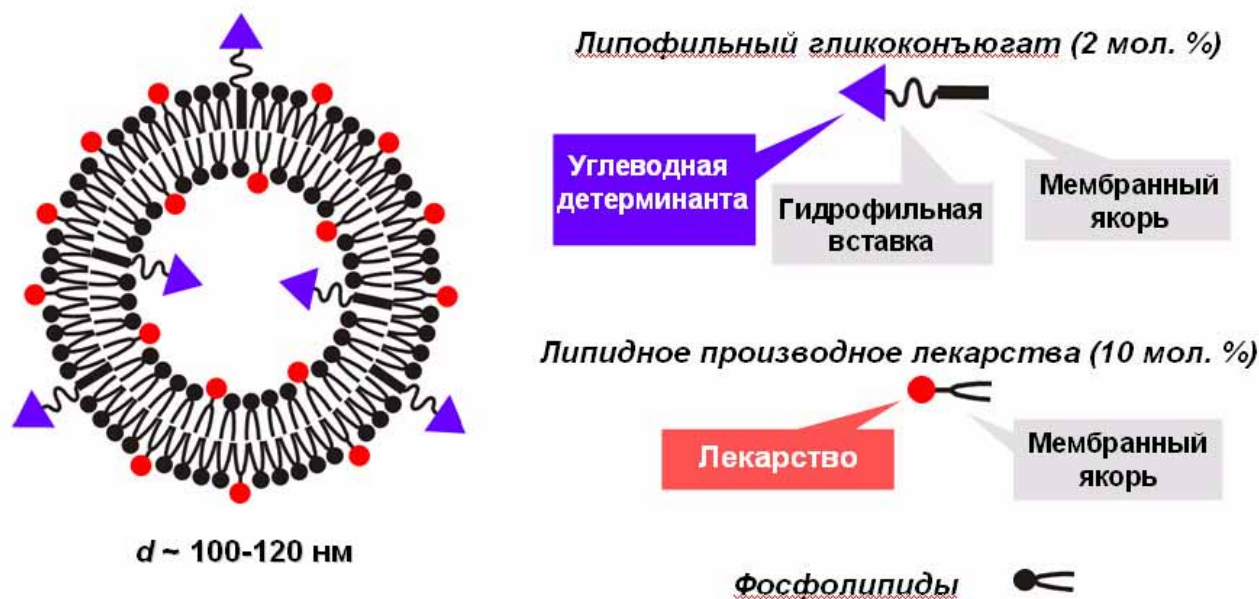


Рис. 4. Структура липосомы, содержащей липидные производные лекарственных субстанций

взаимодействии с клеткой; изменяется механизм проникновения лекарства в клетку и его внутриклеточный трафик, что повышает потенциал преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток; упрощается технология приготовления лекарственных липосом. Для увеличения селективности действия (таргетная терапия) исследователями были сконструированы липосомы, несущие молекулярные «адреса» углеводной природы, синтез которых разработан в ИБХ РАН. В докладе были рассмотрены принципы построения молекул липофильных пролекарств и гликоконъюгатов, способ получения липосомальных препаратов длительного хранения. В ряде недавних работ была показана эффективность предлагаемого подхода на примерах резкого улучшения терапевтических свойств лекарств на моделях экспериментальных животных с раком молочных желез и лимфолейкозами, а также ингибирования пролиферации метотрексат-резистентных клеток лейкемии человека (см., например, Водовозова и др. 2007).



Кандидат биологических наук В.И. Казей, руководитель отдела высокопроизводительного скрининга Исследовательского института химического разнообразия (ИИХР), функционирующего на базе ЦВТ ХимРар, представил доклад на тему «Открытие специфических ингибиторов PI3K сигнальных каскадов: новые

тенденции в разработке противоопухолевых агентов». В рамках оригинальной концепции «химическое разнообразие с точки зрения биологического эффекта» в ИИХР совместно с компанией ChemDiv был разработан ряд фокусированных библиотек химических соединений, предназначенных для эффективного первичного поиска низкомолекулярных модуляторов специфических мишеней или клеточных каскадов. Докладчик представил результаты скрининга библиотеки соединений (5000 соединений, включая 650 структурных хемотипов), «ортогонально» аннотированной по отношению к ряду мишеней. Аннотация включала в себя как «традиционные» (киназы, рецепторы, сопряженные с G-белками, ядерные рецепторы, ионные каналы и протеазы), так и «специальные» биологические мишени (сигнальные каскады и модуляторы динамики микротубулярных белков). С использованием концепции Focused Diversity™ удалось идентифицировать серии эффективных ингибиторов киназы PI3Kα специфического и двойного действия. В частности, были получены два структурных хемотипа с высокой патентоспособностью, в ряду которых были обнаружены эффективные ингибиторы в клеточных и ферментных тестах (100-2000 нМ), с функциональной активностью в диапазоне 4-5 нМ при ингибировании киназы pAkt (ELISA). Селективность этих агентов по отношению к различным киназам составила: PI3Kβ > 50×; PI3Kδ, PI3Kγ > 10×; PKA и 20 других киназ > 100×. Были также получены важные экспериментальные *in vivo* показатели, относящиеся к фармакокинетике, токсичности, эффективности по отношению к клеточным линиям рака прямой кишки и опухолей молочной железы.

Новые биомишени для действия противоопухолевых препаратов и тест-системы биологических испытаний



В рамках второй рабочей сессии было представлено четыре доклада. А.Н. Куимов, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории культур животных клеток НИИ физико-химической биологии МГУ,

выступил с сообщением на тему «Ферменты семейства PARP как платформа для создания новых лекарств». Поли-ADP-рибозилирование является одним из способов посттрансляционной модификации белков, который клетка использует в механизмах защиты ДНК от повреждений, для регуляции митоза и других жизненно важных процессов. К ферментам семейства PARP (поли-ADP-рибоза-полимераз) относят 17 белков, закодированных в геноме человека (Otto et al. 2005). Среди них наиболее изученными являются PARP-1, активируемая разрывами ядерной ДНК, и танкиразы (Dynek & Smith 2004), два сигнальных белка, локализованных в различных клеточных компартментах. Все ферменты этого семейства используют NAD^+ для синтеза поли-ADP-рибозы, ковалентно связанной с рядом специфических белковых субстратов. В отечественных и зарубежных лабораториях изоэнзим танкираза-2 человека был клонирован как опухолевый антиген. Этот фермент в норме экспрессируется в клетках эпителия почечных канальцев и в некоторых других типах дифференцированных клеток. Исследователи НИИ физико-химической биологии МГУ также обнаружили танкиразу-2 в 20-30% исследованных опухолей молочной железы, причем ферментативная активность одной или обеих танкираз была повышена во всех исследованных опухолевых клетках. Функция танкиразы состоит в регуляции длины теломер ДНК, расхождения хромосом при митозе и некоторых других процессов. В табл. 3 показаны результаты недавнего исследования, демонстрирующие увеличенное присутствие танкиразы у пациентов с различными видами опухолей по сравнению со здоровыми людьми. На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что ингибиторы танкиразы и других ферментов семейства PARP могут найти применение при лечении многих заболеваний, в том числе онкологических.

Доклад С.Н. Новикова, старшего научного сотрудника отдела сенсорных систем Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (ИФ РАН), был посвящен перспективам создания новых противоопухолевых препаратов на основе матрицы пиразин-связывающих белков. Пиразин-связывающие белки (англ. pyrazine-binding proteins, PyrBP) относятся к се-

Таблица 3

Присутствие танкиразы (клон МО-BC-203) у пациентов с различными видами опухолей по данным иммунологического теста (Shebzukhov 2007)

Вид опухоли	Присутствие танкиразы по отношению к общему числу образцов (число положит./общее число (%))
Нормальные доноры (нет опухоли)	6/228 (2,6%)
Рак молочной железы	6/60 (10,0%)
Рак прямой кишки	17/116 (14,7%)
Рак шеи	2/31 (6,5%)
Меланома	3/45 (6,7%)
Рак яичников	3/75 (4,0%)
Рак почек	2/51 (3,9%)

мейству низкомолекулярных транспортных белков с молекулярной массой 18-22 кДа – липокалинов, осуществляющих адресный перенос гидрофобных физиологически активных соединений к органу-мишени (или ткани-мишени) в жидких средах (кровь, лимфа, слезы). В докладе был представлен подробный анализ современного состояния экспериментальных исследований по генотоксичности 2,5-диметилпиразина (2,5-DMP), а также дано теоретическое обоснование перспектив создания новой группы противоопухолевых препаратов на основе 2,3,5,6-тетраметилпиразина (TMP, лигустразина), ассоциированного с рекомбинантным пиразин-связывающим белком. Были также рассмотрены принципы конструирования новых лекарственных соединений в составе полимерной матрицы PyrBP (Новиков 2005). Особое внимание было уделено разработке неинвазивных (ингаляционных) методов введения данного комплекса и результатам экспериментальных работ по выделению в клетках обонятельной выстилки и легочной ткани млекопитающих специфических рецепторов к PyrBP. Докладчик аргументировал, что дальнейшие исследования в этом направлении, с одной стороны, могут привести к резкому удешевлению и значительному повышению эффективности действия лекарственных средств, с другой – к снижению нежелательных побочных эффектов.



Доклад Н.Ю. Анисимовой, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Российского Онкологического Научного Центра им. Н.Н. Блохина РАМН, были рассмотрены фармакологически значимые биомаркеры для

терапии рака предстательной железы (РПЖ), а также действующие на них таргетные препараты. РПЖ занимает 3-4 место в мировой структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями среди мужского населения. При этом в США ситуация тревожнее всего - 1 место по заболеваемости (около 300 тыс. больных в год), в Западной Европе 1-2 место (около 200 тыс. больных в год). В России РПЖ занимает 4 место в структуре заболеваемости и 1 место по приросту заболеваемости за последние 10 лет. Основными факторами риска возникновения РПЖ являются генетическая предрасположенность, возраст, расовая принадлежность, воспалительные процессы, малоподвижный образ жизни, «западная» диета, насыщенная жирами животного происхождения и углеводами. Наибольшую проблему для терапии представляет гормонорезистентный РПЖ..

В докладе Н.Ю. Анисимовой обсуждались механизмы развития гормонорезистентности, а также были рассмотрены фармакологически наиболее значимые мишени для действия низкомолекулярных лекарственных веществ (НЛВ). Используемые или перспективные НЛВ для терапии гормонорезистентного РПЖ могут быть условно разделены на ингибиторы андрогенных рецепторов, ингибиторы факторов роста, а также ингибиторы ключевых мишеней клеточного цикла. Весьма перспективен комбинированный подход – совместное использование ингибитора фактора роста и ингибитора клеточного цикла. Значительное внимание в докладе было уделено системам доставки лекарственных веществ, а также вопросам иммунотерапии РПЖ.

Разработка новых лекарственных средств осуществляется авторами в рамках партнерского проекта с Министерством Энергетики США (проект МНТЦ № 3548). В рамках проекта синтезируется и исследуется несколько тысяч потенциальных НЛВ.

Раковая опухоль переходит в фазу безудержного роста и метастазирования благодаря эффективному взаимодействию раковых клеток с элементами стромы, включающей компоненты неоплазматического и воспалительных реакций (как проявление иммунного ответа организма хозяина на опухоль). Как известно, опухоль-ассоциированные лейкоциты (особенно макрофаги), могут не только ингибировать, но и стимулировать опухолевый рост. Поэтому комплексная система тестирования препаратов с предполагаемой противоопухолевой и/или иммуномодулирующей активно-

стью может быть чрезвычайно полезна для оценки как прямого, так и опосредованного действия исследуемых лекарственных субстанций на все вышеперечисленные компоненты опухоли, включая спонтанный рак молочных желез (РМЖ) и лимфолейкоз (ЛЛ) самок мышей линий BLRB/BYRB- и CBRB - Rb(8.17)11Em. Разработке именно такой системы тестирования посвящена работа Е.В. Моисеевой, кандидата биологических наук, научного сотрудника Института биоорганической химии РАН.



В соответствии с разработанной методикой, процесс тестирования включает 4 последовательных этапа. Нулевой цикл – тестирование противоопухолевых препаратов (ПП) *in vitro* на краткосрочных культурах РМЖ и ЛЛ, с одной стороны, и на культурах иммунных клеток как интактных мышей, так и опухоленосителей, с другой. Параллельно ПП тестируют на 1 этапе *in vivo*: на стартовых (летальных и полублетальных), предстартовых и терапевтических перевиваемых сингенных моделях РМЖ и ЛЛ. При получении обнадеживающих результатов тестирования проводят на 2-м этапе уже на спонтанных моделях РМЖ. В качестве заключительного этапа проводят тестирование ПП на предопухолевых моделях: самках мышей линий BLRB/BYRB с 90/95% частотой РМЖ и 10/5% частотой ЛЛ. Последний этап особенно рекомендуется для субстанций с иммуномодулирующей активностью, так как, естественно, состояние иммунного статуса пожилого организма хозяина может повлиять на время возникновения спонтанного РМЖ и/или ЛЛ.

Следует отметить, что Е.В. Моисеева зарегистрирована в международном списке (Великобритания) и на сайте Джексоновской лаборатории (США) как держатель оригинальной коллекции мышей. В настоящее время эта коллекция состоит из 5 линий мышей с частотой РМЖ от 90/95% у родственных линий BLRB/BYRB до 10-5% у линий A/JSnCitMoise и BALB/cJCitMoise при промежуточной, 50% частоте злокачественного РМЖ у мышей линии CBRB. При этом практически все самки линии CBRB к 12-месячному возрасту демонстрируют доброкачественные опухоли – множественные лактирующие аденомы и к 18-месячному возрасту – эпителиальные опухоли яичника и матки.

Поиск противоопухолевых препаратов на основе новых технологий генерации знаний

Текущий этап развития исследований в области создания новых лекарственных препаратов характеризуется интенсивным накоплением эмпирических дан-

ных. К сожалению, их еще нельзя отождествлять со знаниями, так как последние представляют из себя результат детального анализа, систематизации и обработки экспериментальных фактов. Ввиду значительных объемов и сложной структуры имеющихся в настоящее время химико-биологических данных, процесс генерации знаний представляет из себя нетривиальный, но чрезвычайно важный этап современных исследований. Именно этой проблеме была посвящена последняя научная сессия конференции, включающая в себя четыре научных доклада.



В докладе доктора биологических наук В.В. Пороикова, заместителя директора по научной работе, заведующего лабораторией структурно-функционального конструирования лекарств ГУ НИИ

биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, была поднята тема компьютерного поиска противоопухолевых препаратов мультитаргетного действия. Основная парадигма создания новых лекарств в XX веке базировалась на

представлении об избирательном действии препарата на определенную молекулярную мишень, которое должно приводить к нормализации патологического процесса; при этом взаимодействие с другими мишенями в организме обычно связывали с возникновением нежелательных побочных эффектов и токсичности. С развитием постгеномных исследований стало ясно, что многие заболевания имеют сложную этиологию, и возникла концепция лекарств множественного действия, которые обладают преимуществами по сравнению с препаратами, селективно действующими на единственную мишень. Поиск таких лекарств может базироваться на прогнозе спектра биологической активности с использованием компьютерной системы PASS, разработанной докладчиком и его коллегами (Poroykov et al. 2003). Эта программа способна предсказывать более 3000 видов биологической активности и молекулярных механизмов действия со средней точностью около 95% (Geronikaki et al. 2004). В качестве иллюстрации на рис. 5. представлен вид поисковой панели программы PASS с результатами поиска потенциальных мультитаргетных препаратов, активаторов апоптоза. В докладе обсуждались возможности определения перспективных наборов молекулярных мишеней методами биоинформатики и выявления прототипов лекарств множественного действия в базах данных доступных образцов химических соединений.

The screenshot shows the PASS software interface. The top panel displays several chemical structures. The main panel shows a list of predicted activities for a selected compound (ID: 6163341). The activities listed include:

- 0.260 0.048 FMN reductase inhibitor
- 0.298 0.078 Threonine aldolase inhibitor
- 0.297 0.078 Botulinum inhibitor
- 0.284 0.066 Myeloblastin inhibitor
- 0.356 0.136 Transplant rejection treatment
- 0.337 0.119 CyP2C9 inhibitor
- 0.255 0.048 (S)-3-hydroxyacid ester dehydrogenase inhibitor
- 0.291 0.065 Pseudouridylyl synthase inhibitor
- 0.301 0.085 Mapin B inhibitor
- 0.309 0.093 Alcohol dehydrogenase [NAD(P)-] inhibitor
- 0.343 0.127 Hydroxylamine oxidase inhibitor
- 0.259 0.045 NADPH quinone reductase inhibitor
- 0.274 0.061 Cyclopentanone monooxygenase inhibitor
- 0.278 0.066 Antipruritic
- 0.304 0.093 N-methylglutathione (ATP-hydrolyzing) inhibitor
- 0.240 0.030 Xanthine oxidase inhibitor
- 0.313 0.105 Nicotinate dehydrogenase inhibitor
- 0.471 0.265 Myocardial ischemia treatment
- 0.294 0.090 CYP2A2 substrate
- 0.262 0.058 Carcinogenic, group 3
- 0.345 0.141 3-Hydroxybenzoate 6-monooxygenase inhibitor
- 0.340 0.137 Antineoplastic
- 0.371 0.169 Oxygen scavenger
- 0.310 0.109 Pulutanase inhibitor
- 0.324 0.172 Apoptosis agonist
- 0.382 0.182 1-leucine dehydrogenase stimulant
- Substance that stimulates apoptosis of cells

The bottom panel shows the 'New Descriptors' section with a list of descriptors and their values:

- Pa: 0.382 0.182 1-leucine dehydrogenase stimulant
- Fi: 0.382 0.182 1-leucine dehydrogenase stimulant
- Pa: 0.382 0.182 1-leucine dehydrogenase stimulant
- Fi: 0.382 0.182 1-leucine dehydrogenase stimulant

Рис. 5. Результаты поиска активаторов апоптоза при помощи программы PASS



Кандидат биологических наук Г.Н. Апрышко, руководитель группы Банка данных по противоопухолевым веществам отдела экспериментальной химиотерапии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

Российского онкологического центра (РОНЦ) им. Н.Н. Блохина РАМН, представила в своем докладе специализированную базу данных РОНЦ РАМН. За более чем полувековую деятельность этого крупного научного центра по поиску и разработке лекарств для лечения рака были изучены тысячи синтетических и природных веществ. В результате этих исследований были не только внедрены в клиническую практику эффективные противоопухолевые лекарства, но и накоплен большой объем информации по результатам экспериментов. Результаты были получены в унифицированных условиях одного и того же учреждения, преимущественно не опубликованы или публиковались в изданиях, имеющих ограниченное распространение. Эта информация была организована в Банк данных, содержащий архив первичных документов, картотеку паспортов на вещества и компьютерную Базу данных (Апрышко и Решетникова 2007). В Базе данных представлены химические структуры, номенклатурные характеристики, физико-химические свойства, качественные и количественные данные по результатам первичного тестирования и углубленного изучения цитотоксичности и противоопухолевой активности в различных тест-системах около 12000 синтетических веществ и природных экстрактов, изученных в РОНЦ РАМН и ряде других отечественных научных учреждений. В докладе была представлена структура Базы данных, основные химические классы веществ. Были рассмотрены возможности использования Базы данных для информационного обеспечения работ по созданию новых противоопухолевых лекарств и в аналитических исследованиях в области экспериментальной химиотерапии опухолей, а также для формирования обучающих массивов при компьютерном прогнозировании на этапе доэкспериментального скрининга цитостатической активности *in vitro* и противоопухолевой активности *in vivo* с помощью системы PASS и ДСМ-метода.

Последние два доклада конференции были представлены молодыми исследователями, работающими в области компьютерного конструирования лекарств. Одна из наиболее актуальных задач поиска новой противоопухолевой терапии - идентифицировать белки, которые участвуют в возникновении и развитии злокачественных новообразований и отобрать среди них наиболее перспективные мишени.



О.Н. Коборова, лаборант-исследователь ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, студентка пятого курса факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М.В. Ломоносова, рассказала о разработке нового компьютерного алгоритма выявления молекулярных

биомишеней для действия противоопухолевых соединений. Предложенный алгоритм моделирует сети регуляции клеточного цикла логическими сетями. Входными данными являются состояния вершин сети (белков и/или генов) в начальный момент времени; выходными – набор состояний вершин в разные моменты времени – траектории. Для выявления белков, воздействие на которые наиболее существенно изменяет траектории желательным образом (например, стимуляция апоптоза раковых клеток без влияния на здоровые), состояние вершин фиксируется согласно виду предполагаемого воздействия, например, ингибирование соответствующего белка или белков.

Метод был апробирован на примере рака молочной железы с использованием молекулярной сети, состоящей из 85 вершин: 73 белков, 7 белковых комплексов и 5 генов из базы данных TRANSPATH (<http://www.biobase.de>), и данных об экспрессии, содержащих список гипо- и гиперэкспрессированных белков из базы данных Cyclonet (<http://cyclonet.biouml.org>). Было обнаружено, что при ингибировании PIN1 или одновременном ингибировании пары PLK1 и MDM2, траектория изменяется в сторону наступления апоптоза раковых клеток. При этом для белков PLK1 и MDM2 уже известны лиганды, которые находятся на стадии доклинических тестирований, в то время как для новой мишени PIN1 требуется экспериментальное подтверждение ее перспективности.



Последний доклад рабочей программы конференции представил А.Э. Воронков, научный сотрудник химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. В продолжение темы поиска новых ингибиторов

каскадов эмбрионального развития, поднятой С. Крауссом, молодой российский исследователь продемонстрировал свежие данные компьютерного моделирования взаимодействий между компонентами Wnt сигнального каскада. В ходе работы была сконструиро-

вана пространственная модель комплекса Wnt белка с димерным CRD-доменом рецептора Frizzled; формирование указанного комплекса является критически важным событием для передачи сигнала по Wnt каскаду. Были выявлены критические аминокислотные остатки, необходимые для эффективного связывания, и построена докинг-модель, пригодная для отбора потенциальных ингибиторов Wnt-Frizzled взаимодействий. При помощи последней был произведен компьютерный отбор 500 соединений из 10 000 соединений. Отобранные вещества в настоящее время проходят биологическое тестирование.

Тенденции

Анализ представленных на конференции докладов позволяет выявить некоторые общие тенденции в современных исследовательских программах, посвященных разработке противоопухолевых агентов. По мнению большинства исследователей, наиболее принципиальные проблемы связаны с возникновением лекарственной устойчивости опухолевых клеток и чрезвычайно комплексными механизмами жизнедеятельности клеток в патологическом состоянии. В качестве инструментов для решения этих проблем предлагаются различные подходы: поиск и всесторонние исследования опухолевых биомишеней; создание адекватных экспериментальных моделей; развитие методов синтеза и тестирования химических соединений; использование передовых компьютерных алгоритмов и баз данных.

Исследования, посвященные поиску наиболее перспективных для терапевтического воздействия биомишеней, занимают заметное место в современных научных работах. Не удивительно, что абсолютное большинство докладов на конференции было посвящено – прямо или косвенно – именно опухолевым биомишеням (Я.В. Лавровский, С. Краусс, А.А. Штиль, С.А. Лакатош, В.И. Казей, А.Н. Куимов, С.Н. Новиков, Н.Ю. Анисимова, В.В. Поройков, О.Н. Коборова, А.Э. Воронков). Современные разработчики используют обширный арсенал средств – анализ геной экспрессии, методы хемогеномики и протеомики, компьютерный анализ данных и моделирование взаимодействий лиганд-биомишень.

Эффективные исследования по-прежнему невозможны без целенаправленных усилий *химиков-синтетиков*, необходимых практически на всех этапах создания новых лекарств. Арсенал методов синтетической химии постоянно совершенствуется, позволяя проводить направленные модификации сложных структур натуральных соединений (А.А. Штиль), получать комплексные конъюгаты низкомолекулярных лекарств с биомолекулами (Е.Л. Водовозова), а также синтезировать большие массивы соединений при помощи передовых методов комбинаторной химии (С.А. Лакатош, В.И. Казей).

Чрезвычайно важной задачей является создание адекватных *экспериментальных моделей*, позволяющих изучать механизмы развития опухолей, а также

исследовать химические соединения, влияющие на эти процессы. Для решения этой задачи привлекают современные технологии геной инженерии, позволяющие создавать, например, генетически измененные линии животных, являющихся наиболее приближенными к человеку моделями (Е.В. Моисеева). Все большую роль играют экспериментальные *in vitro* модели, позволяющие осуществлять высокопроизводительный скрининг библиотек химических соединений на активность по отношению к опухолевым биомишеням (Я.В. Лавровский, В.И. Казей).

Нанотехнологические разработки позволяют реализовывать новые подходы к терапии опухолей. Так, чрезвычайно интересные разработки на эту тему были представлены Я.В. Лавровским (биодградируемые полимерные системы, Нанотаксол), а также Е.Л. Водовозовой (липосомальные системы доставки противоопухолевых лекарств). Перспективы нанотехнологических подходов в лечении рака предстательной железы обсуждались в докладе Н.Ю. Анисимовой.

Наконец, еще одной тенденцией, на которую хотелось бы обратить внимание, это все более интенсивное использование *компьютерных систем* моделирования (А.Э. Воронков) и анализа данных (В.В. Поройков, О.Н. Коборова, В.И. Казей), в том числе основанных на специализированных базах данных (Г.Н. Апрышко), имеющих целью направленный, рациональный поиск новых лекарств. Подобные системы становятся неотъемлемой частью современных исследовательских программ.

Таким образом, можно резюмировать, что прошедшая конференция в очередной раз продемонстрировала определяющую роль «постгеномных» технологий в сфере разработки противоопухолевых лекарственных субстанций. Ситуация в этой, а также большинстве других областей исследований в мировой фармацевтической индустрии в настоящее время характеризуется интенсивной эксплуатацией новейших технологий исследований, включая дисциплины геномики, протеомики, комбинаторного синтеза, биологического и компьютерного скрининга.

* * *

Многочисленные опухолевые патологии остаются одними из самых коварных и непредсказуемых заболеваний, вносящих, по данным Всемирной Организации Здравоохранения, наибольший вклад в смертность населения планеты. Вместе с тем, колоссальные усилия ученых и врачей во всем мире привели к существенному прогрессу в выяснении механизмов развития опухолей, а также к выработке новых эффективных методов противодействия этим процессам. Полученные результаты позволяют более оптимистично оценивать перспективы разработки противоопухолевых лекарств нового поколения.

По мнению многих участников конференции, высказанному в ходе докладов и многочисленных дискуссий, а также проведенного организаторами анкетирования, состоявшийся форум отличался высоким

научным и организационным уровнем. Например, д-р Я.В. Лавровский (ChemDiv, Inc., США) так оценил состоявшийся форум: «Технологии исследований, основанные на достижениях «геномной революции», способны дать огромный эффект. Сегодня мы увидели целый ряд работ, которые в скором будущем приведут к реальным лекарствам на аптечном прилавке. Прекрасный конгресс, поздравляю организаторов!». По словам ученого секретаря конференции, д.х.н. К.В. Балакина (ЦВТ ХимРар), «потенциал исследований, основанных на передовых достижениях геномики и протеомики, пока еще не реализуется в полной мере... Организуя этот конгресс, мы ставили задачу более активного внедрения этих концепций в теорию и практику современной фармакологии».

С научной программой конференции, пресс-релизами и сопутствующей информацией читатели могут познакомиться на специализированном Интернет-сайте <http://www.chemrar.ru/files/k6.html>.

ЛИТЕРАТУРА

- Апрышко Г.Н., Решетникова В.В. Регистрационно-номенклатурный и химический модули электронной базы данных Информационной системы по противоопухолевым агентам. *Научно-техническая информация* 2007, 6, 24-31.
- Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Гаенко Г.П., Молотковский Ю.Г. Липосомы с диглицеридным конъюгатом метотрексата: активность в культуре метотрексат-резистентных клеток лейкемии. *Биоорг. Химия* 2007, 33 (4): 470-473.
- Новиков С.Н. Перспективы интраназальной формы 2,3,5,6-тетраметилпиразина (лигустразина) в прикладной медицине. Материалы 2-й международной конференции «Наука, бизнес и образование», 10-13 мая 2005 г., Пушкино, стр. 89.
- Cohen P. Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug. Disc.*, 2002, 1, 309.
- Dyneke J.N., Smith S. Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. *Science* 2004, 304(5667), 97-100.
- Geronikaki A.A., Dearden J.C., Filimonov D., Galaeva I., Garibova T.L., Glorizova T., Krajneva V., Lagunin A., Macaev F.Z., Molodavkin G., Poroikov V.V., Pogrebnoi S.I., Shepeli F., Voronina T.A., Tsitlakidou M., Vlad L. Design of new cognition enhancers: from computer prediction to synthesis and biological evaluation. *J Med Chem.* 2004, 47(11), 2870-2876.
- Kiselyov A.S., Tkachenko S.E., Balakin K.V., Ivachtchenko A.V. Small molecule modulators of Hh and Wnt signaling pathways. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2007, 11(8), 1-15.
- Otto H., Reche P.A., Bazan F., Dittmar K., Haag F., Koch-Nolte F. In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC Genomics* 2005, 6, 139.
- Poroikov V.V., Filimonov D.A., Ihlenfeldt W.D., Glorizova T.A., Lagunin A.A., Borodina Y.V., Stepanchikova A.V., Nicklaus M.C. PASS biological activity spectrum predictions in the enhanced open NCI database browser. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2003, 43, 228-236.
- Simonova V.S., Samusenko A.V., Filippova N.A., Tevyashova A.N., Lyniv L.S., Kulik G.I., Chekhun V.F., Shtil A.A. Olivomycin induces tumor cell apoptosis and suppresses p53-induced transcription. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005, 139(4), 455-459.
- Shebzukhov Y.V., Lavrik I.N., Karbach J., Khlgatian S.V., Koroleva E.P., Belousov P.V., Kashkin K.N., Knuth A., Jager E., Chi N.W., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Human tankyrases are aberrantly expressed in colon tumors and contain multiple epitopes that induce humoral and cellular immune responses in cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007, in press.
- Taipale J. & Beachy P.A. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. *Nature* 2001, 411(6835), 349-354.

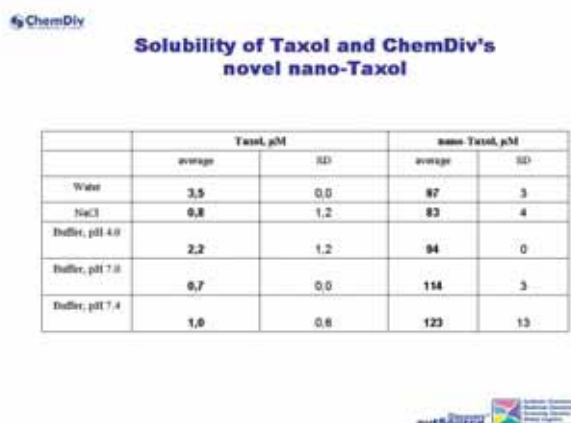
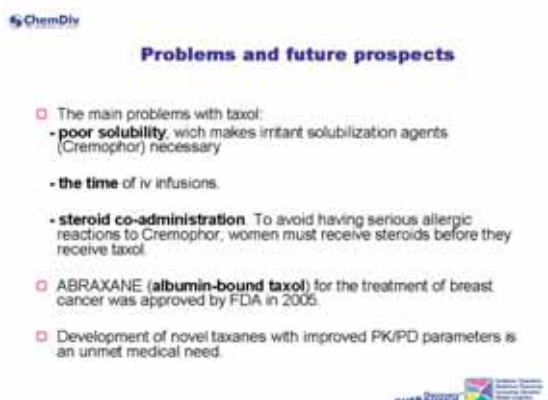
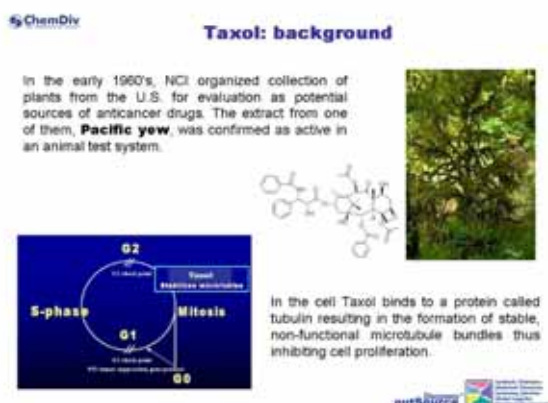
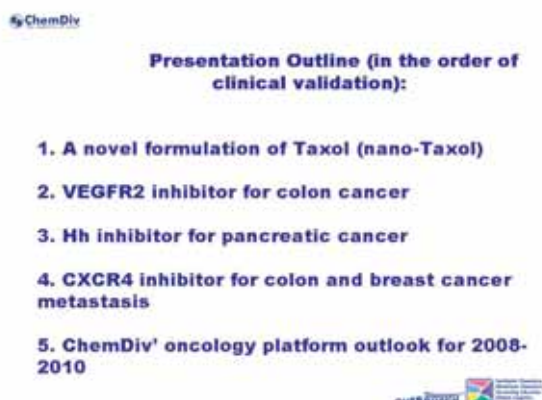
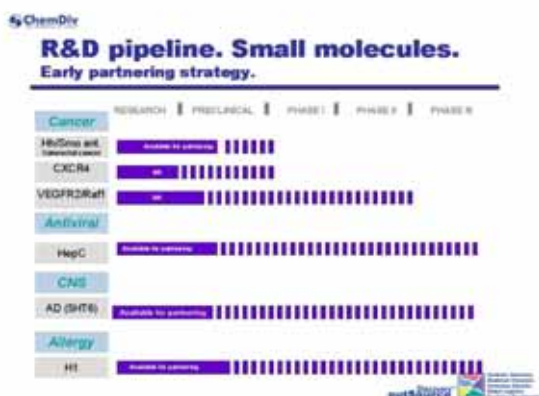
НАУЧНАЯ ПРОГРАММА

Ян В. Лавровский

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СУБСТАНЦИЙ НА ОСНОВЕ НОВЕЙШИХ БИОМИШЕНЕЙ. ОНКОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА КОМПАНИИ CHEMDIV

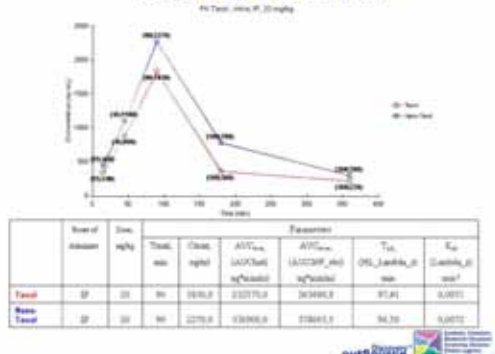
ChemDiv, Inc., Сан Диего, США

Достижения геномики и протеомики выражаются, в частности, в интенсивных исследованиях новых биомешеней, вовлеченных в процессы развития опухолей. В докладе известного американского ученого российского происхождения, занимающегося проблемами молекулярной биологии рака, представлены некоторые современные подходы к разработке новых противоопухолевых лекарств, активность которых связана с модулированием функций подобных биомешеней.



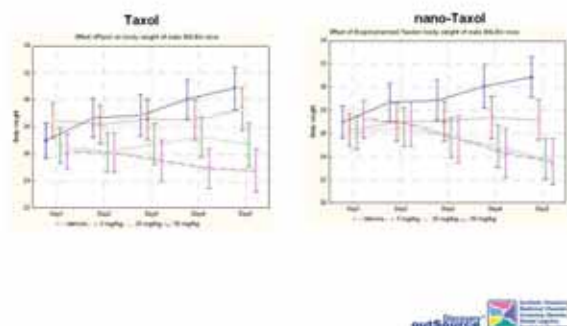
ChemDiv

Nano-Taxol has a more favorable PK compare to that of Taxol



ChemDiv

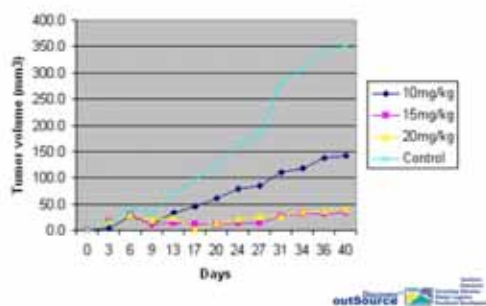
Taxol and nano-Taxol exhibit similar Tox-curves



ChemDiv

Taxol: a dose response curve

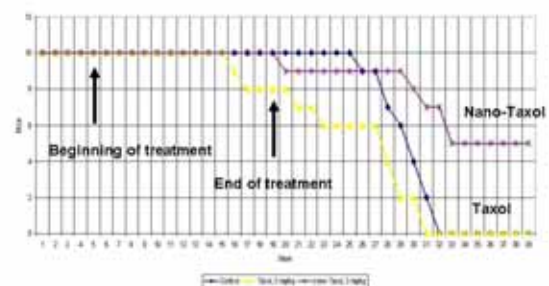
Effect of taxol on xenograft growth



ChemDiv

Nano-Taxol is more efficacious in treating hepatoma-bearing mice compare to Taxol

Survival of nano-Taxol treated mice (2 mg/kg) after hepatocarcinoma 2B injection



Taxol and nano-taxol were administrated i.p., once daily, for 14 days

outsOURCE

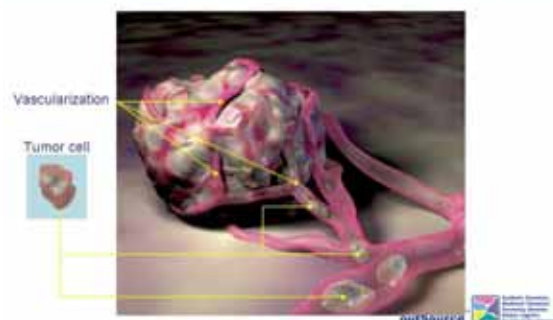
MALIGNANT TUMORS NEED A BLOOD SUPPLY TO GROW



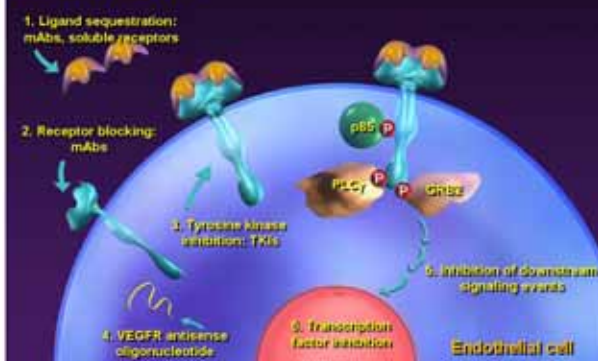
THE ANGIOGENIC SWITCH TRIGGERS GROWTH OF NEW VESSELS



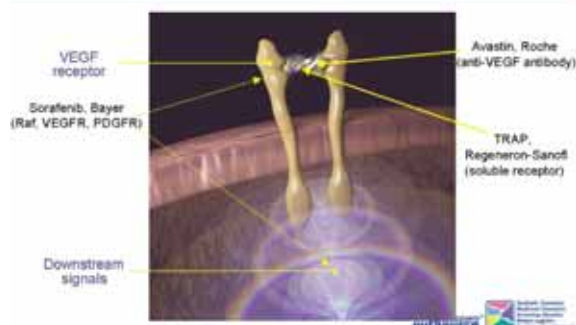
ANGIOGENESIS AND VASCULARIZATION SUPPORT TUMOR GROWTH AND METASTASIS



Approaches to VEGF Signal Inhibition

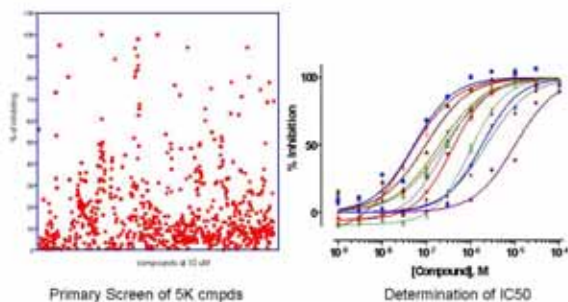


VEGF TRIGGERS MULTIPLE DOWNSTREAM SIGNALS THAT PROMOTE ANGIOGENESIS



ChemDiv

VEGFR2 small molecule inhibitor: screening



outSource

ChemDiv

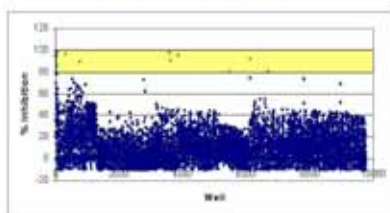
Kinase profile of 2 VEGFR-molecules

CD-009-0168 and CD-009-0169
Kinase profiles

Enzyme	% inhibition (10 ⁻⁶ M)	
	(CD-101-101)	(CD-101-102)
EGFR	3.2	0.1
MEK1	1.4	2.8
MEK2	1.2	4.9
ERK	91.7	27.7
ERK5	94.2	21.2
PLK1	101.1	92.8
ERK8	100.0	59
PKAα	3.9	3.9
CDK2C p32	0	0
AraA	10.3	7.7
SLC1	10.3	7.8
SAPI	12.2	1.9

ChemDiv

Primary Screening for Hh Inhibitors



Cell-based assay in C3H10T1/2 cells

Native signaling machinery in natural membrane environment undergo osteocyte-like differentiation in response to Hh treatment can be detected by increase in intracellular Alkaline Phosphatase (AP) activity.

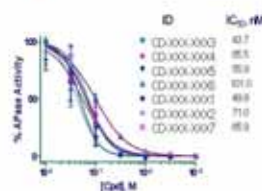
outSource

ChemDiv

Screening for Hh inhibitors and hit validation

Screening of 10000 compounds:

- Potency profiling (IC₅₀) of the hits
- Therapeutic index (Inhibition Potencies vs Cytotoxicity)
- Competitive/non-competitive inhibitors



Compound ID	AP inhibition IC ₅₀ , M	Cytotoxic effect IC ₅₀ , M	CytAP
CD-005-0001	3.94E-08	1.12E-06	980
CD-005-0002	1.21E-07	5.54E-06	119
CD-005-0003	1.96E-08	1.65E-06	1000
CD-005-0004	3.39E-07	1.80E-06	29
CD-005-0005	3.21E-07	1.59E-06	61
CD-005-0006	8.42E-07	1.29E-06	1300
CD-005-0007	2.65E-08	1.95E-06	148000

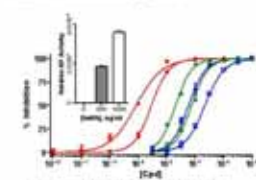
outSource

ChemDiv

Competition for Cyclopamine and Compounds with Hedgehog Induced Activity

Hh Competitive inhibitors

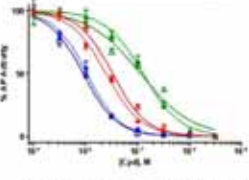
In the presence of higher Hh concentration, inhibition curves shift rightward



Hh at 500 ng/ml		Hh at 1000 ng/ml	
CD-005-0001	CD-005-0002	CD-005-0001	CD-005-0002
CD-005-0003	CD-005-0004	CD-005-0003	CD-005-0004
CD-005-0005	CD-005-0006	CD-005-0005	CD-005-0006

Hh non-competitive inhibitors

Rightward shift of the inhibition curves upon increase in concentration of sHh is absent

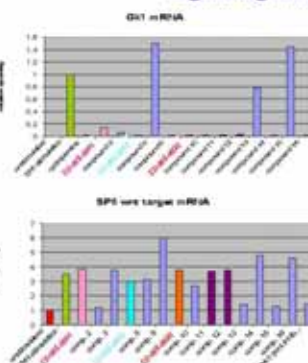


sHh at 500 ng/ml		sHh at 1000 ng/ml	
Compound ID	IC ₅₀	Compound ID	IC ₅₀
CD-005-0001	1.10E-07	CD-005-0001	1.10E-07
CD-005-0002	1.21E-07	CD-005-0002	1.21E-07
CD-005-0003	1.96E-08	CD-005-0003	1.96E-08
CD-005-0004	3.39E-07	CD-005-0004	3.39E-07

outSource

ChemDiv

Representative Real-time Analysis of sHh- and Wnt- (nonspecific to Hh) signaling Inhibition



Stefan Kraus'Lab

outSource

ChemDiv

Growth inhibitory effect



Panc 05.04, 500 nM, 7 days

CD-005-0001 reduces growth in:
 - Neural stem cells (NSC) (50%)
 - Panc 05.04 (80% reduction)
 - Panc 03.27 (56% reduction)
 - MaPaCa-2 (40% reduction)
 No or little effect in: BxPC3, Panc1



Panc 05.04, 500 nM, 7 days



Panc 05.04, 500 nM, 7 days

CD-005-0002 reduces growth in:
 - NSC (20% reduction)
 - Panc 1 (40% reduction)
 - Panc 05.04 (73% reduction)
 - Panc 03.27 (72% reduction)
 - MaPaCa-2 (47% reduction)



Panc 05.04, 500 nM, 7 days



Panc 05.04, 500 nM, 7 days

CD-005-0020 reduces growth in:
 - Panc 05.04 (75% reduction)
 - BxPC3 (35% reduction)
 - Panc 03.27 (40% reduction)
 - MaPaCa-2 (40% reduction)

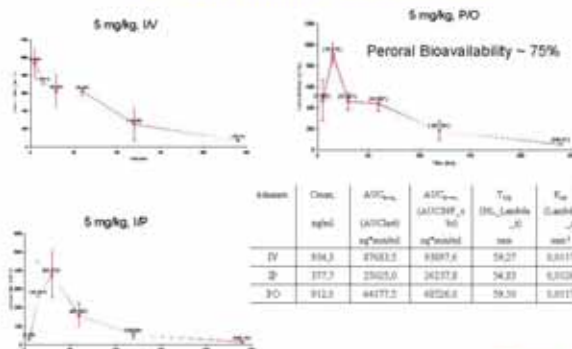


Panc 05.04, 500 nM, 7 days

outSource

ChemDiv

Pharmacokinetic of CD-005-0002

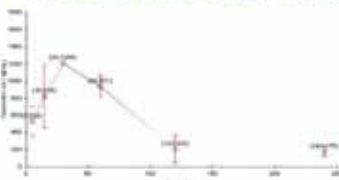


Route	Dose, mg/kg	AUC _{0-24h} (h·ng/ml)	AUC _{0-24h} (h·ng/ml)	T _{1/2} (h)	C _{max} (ng/ml)
		(AUC _{0-24h})	(AUC _{0-24h})	(T _{1/2})	(C _{max})
		mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
IV	504.3	2703.5	1807.6	58.27	0.0117
PO	377.7	2703.5	2427.8	74.83	0.0128
IP	912.0	4417.2	4825.6	58.50	0.0117

outSource

ChemDiv

PK of CD-005-0021, IP, 5 mg/kg

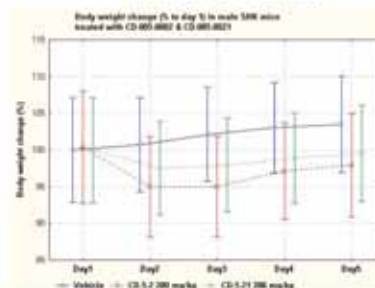


Route	Dose, mg/kg	Parameters					
		T _{max} (h)	C _{max} (ng/ml)	AUC _{0-24h} (h·ng/ml)	AUC _{0-24h} (h·ng/ml)	T _{1/2} (h)	C _{min} (ng/ml)
IV	5	60	241.7	9916.7	21404.0	70.23	0.0000
PO	5	60	241.7	9916.7	21404.0	70.23	0.0000

outSource

ChemDiv

Preliminary Toxicity of CD-005-0002 and CD-005-0021

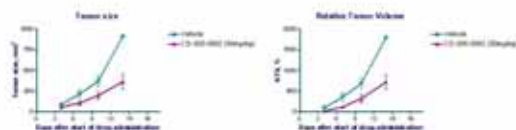


MTD of both compounds is more than 200 mg/kg

outSource

ChemDiv

PANC-1 xenograft model



- 8-weeks old Balb-c/nude mice used
- Injected 4×10^6 cells (PANC-1 – human pancreatic carcinoma) per mouse
- Drug administration was started 7 days after tumor transplantation (medium tumor size 30-60 mm³)
- Drug administration – PiO, 1 time per day, as a suspension with Tween-80

outSource

ChemDiv

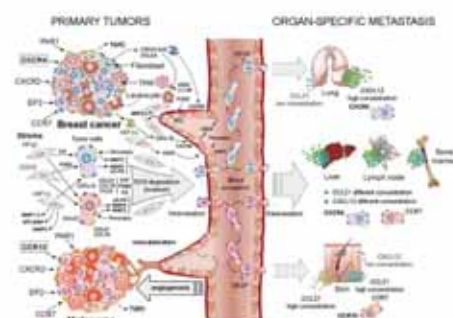
Chemokine receptor CXCR4: "old school" mechanism of action



outSource

ChemDiv

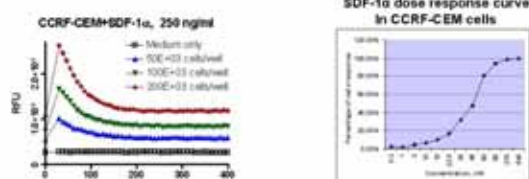
CXCR4 in cancer



outSource

ChemDiv

Assay development procedure

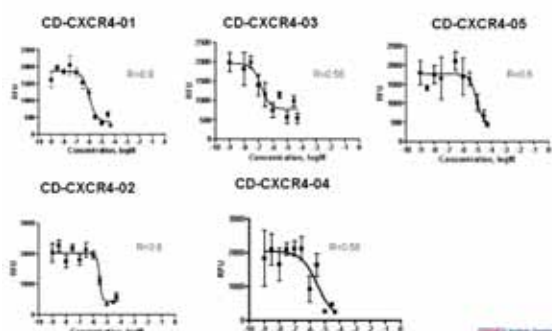


- Selection of cell line with high CXCR4 expression and Ca²⁺ response to agonist
- Agonist dose response curve
- Optimum cell density
- Optimum dye loading conditions: concentration/ T/C/time dependence
- DMSO tolerance
- Reagents stability at RT
- Statistic characteristics (%CV, S/B, S/N, Z')

outSource

ChemDiv

Hits: IC50 detection

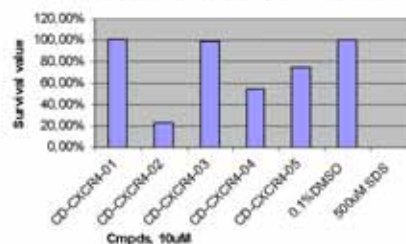


outSource

ChemDiv

Compounds cytotoxicity

Cytotoxicity of cmpds in AlamarBlue assay

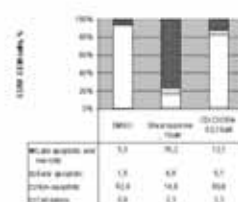


outSource

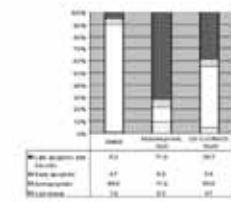
ChemDiv

CD-CXCR4-03 doesn't induce apoptosis in CCRF-CEM cells

CCRF-CEM cells were treated with 10μM of CXCR4-03 for 24 hours



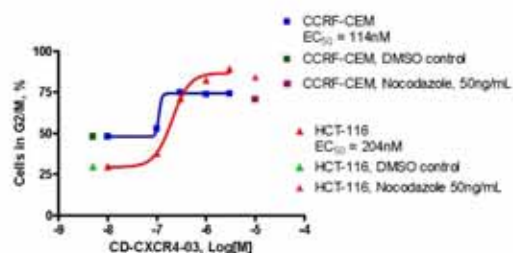
CCRF-CEM cells were treated with 10μM of CXCR4-03 for 47 hours



outSource

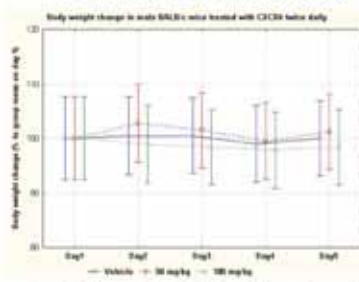
ChemDiv

CD-CXCR4-03 blocks G2/M entry

*Treatment time: 36 h (HCT-116)
48 h (CCRF-CEM)

outSource

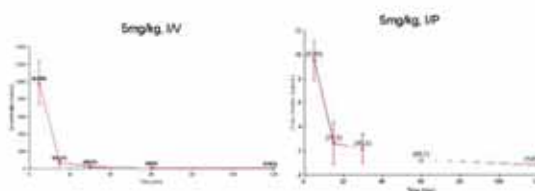
ChemDiv

Preliminary Toxicity Study

BALB/c mice, males (n=8) were treated i/p with different doses of CD-CXCR4 for 5 days, 2 times per day. The body weight and the mice survival were monitored. MTD is more than 100 mg/kg

outSource
Pharmaceutical Research
Contract Research
Pharmaceutical Research
Contract Research

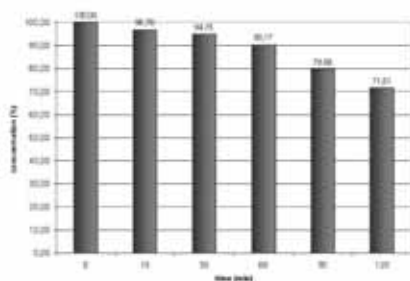
ChemDiv

PK of CD-CXCR4-03

Route of Administration	Dose, mg/kg	Time, min	C _{max} , ng/ml	Parameters			
				AUC _{0-∞} , (AUC _{0-24h}) ng*hr/ml	AUC _{0-∞} , (AUC _{0-24h}) ng*hr/ml	T _{1/2} , (T _{1/2} last obs.) min	K _{el} , (C _{last} /C ₀) min ⁻¹
Arterial	20	5	101.0	10394.5	10117.2	32.80	0.021
Venous	20	5	9.8	230.5	119.3	64.76	0.0107

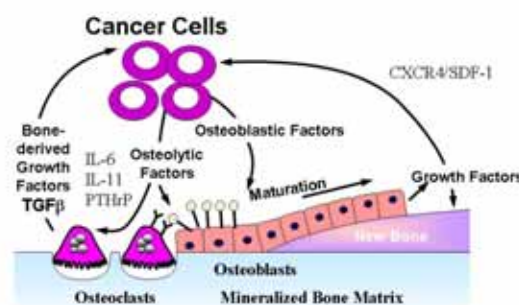
outSource
Pharmaceutical Research
Contract Research
Pharmaceutical Research
Contract Research

ChemDiv

Stability of CXCR4-03 in the S9-fraction

outSource
Pharmaceutical Research
Contract Research
Pharmaceutical Research
Contract Research

ChemDiv

Tumor-Bone Cell Interaction

outSource
Pharmaceutical Research
Contract Research
Pharmaceutical Research
Contract Research

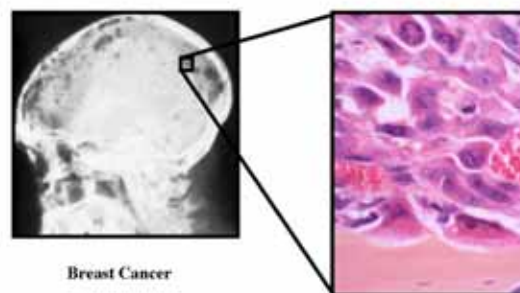
ChemDiv

Bone Involvement in Advanced Malignancy

	Incidence
Myeloma	70-95%
Renal	20-25%
Melanoma	14-45%
Bladder	40%
Thyroid	60%
Lung	30-40%
Breast	65-75%
Prostate	65-75%

outSource
Pharmaceutical Research
Contract Research
Pharmaceutical Research
Contract Research

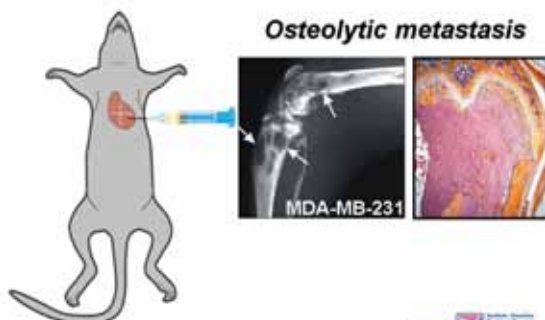
ChemDiv

Osteolytic Metastases

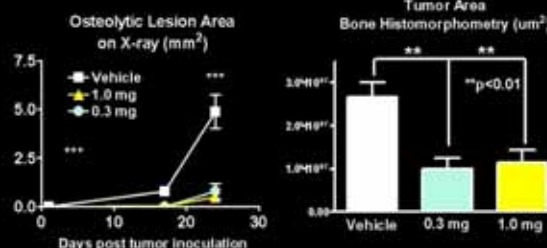
Breast Cancer

outSource
Pharmaceutical Research
Contract Research
Pharmaceutical Research
Contract Research

ChemDiv

In vivo Model

outSource
Pharmaceutical Research
Contract Research
Pharmaceutical Research
Contract Research

TGFβ RI Inhibition Reduces Development of MDA-MB-231 Osteolytic Bone Metastases

ChemDiv

ChemDiv' oncology platform (2008-2010):**A. Small molecules:**

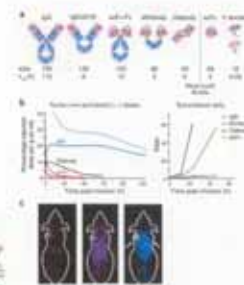
1. Development of existing molecules/targets
2. New targets (Hsp 90, integrins, HDAC, PI3K/mTOR dual inhibitors)
3. Next in class approach (Sorafenib)
4. Prostate cancer grant (Department of Energy)



ChemDiv

ChemDiv' oncology platform (2008-2010):**B. Proteins:**

1. Agonists
2. Antibodies




*С. Краус¹, О. Мачон¹, М. Стрэнд¹, Д. Уэйлер¹,
И.М. Окунь², С.Е. Ткаченко², А.В. Иващенко², Я.В. Лавровский²*

WNT И HH СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ: ПРОСТОЙ ЯЗЫК ДОБРА И ЗЛА

¹Биомедицинский инновационный центр, Национальный госпиталь/университет, Осло, Норвегия

²ChemDiv, Inc., Сан Диего, США

*А.А. Штиль¹, А.Н. Тевяшова², Л.Г. Деженкова²,
А.В. Самусенко¹, Е.Н. Олсуфьева², М.Н. Преображенская²*

ОЛИВОМИЦИН А – МОЩНЫЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ АНТИБИОТИК: МЕХАНИЗМЫ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ И ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ

¹ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва

²ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе РАМН, Москва

Исследования фармакологических регуляторов генной транскрипции и пролиферации клеток перспективны для создания новых противоопухолевых препаратов. Антибиотик оливомицин А (**1**) – производное ауреоловой кислоты – мощный индуктор апоптоза: гибель 50% клеток линий рака толстой кишки, молочной железы, меланомы и лейкоза человека достигается при действии ~ 50 нМ **1** в течение 24 час. Соединение образует комплексы с узкой бороздкой ДНК в GC-богатых областях, и его цитотоксичность обусловлена ингибированием. Микрочип-анализ генной экспрессии выявил снижение мРНК ~ 50% генов. Наибольшее подавление экспрессии отмечено для генов, продукты которых важны для выживания клеток: субъединица VI цитохромоксидазы и протимозин-альфа (снижение соответственно в 10 и 8 раз). В низких концентрациях (<25 нМ) **1** вызывал активацию р53-зависимой транскрипции гена-репортера, а в более высоких – блокировал р53-зависимую трансактивацию. В относительно высоких концентрациях (500 нМ) **1** снижал репликацию ДНК в клетках. Ингибирование матричных синтезов может быть обусловлено подавлением активности топоизомеразы I (ИК₅₀ ~ 25 нМ). Разработаны методы химической модификации **1** для создания соединений с выраженной противоопухолевой активностью и улучшенным терапевтическим индексом. Производное ЛХТА-1297 проявило цитотоксичность в культурах опухолевых клеток и противоопухолевую активность у животных с перевивным лейкозом Р388. Проводится углубленное доклиническое исследование этого модифицированного антибиотика.

С.А. Лакатош¹, М.Н. Преображенская¹, А.А. Штиль², В.Н. Даниленко³

СОЗДАНИЕ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНКИНАЗ ДЛЯ ПРЕОДОЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ИНФЕКЦИЙ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

¹ГУ НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф.Гаузе РАМН, Москва

²ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва,

³Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Серин-треониновые и тирозиновые протеинкиназы – ферменты, участвующие в передаче сигналов от клеточной мембраны к ядру и аппарату генной транскрипции, играют ключевую роль в развитии основных заболеваний человека, включая диабет, шизофрению, сердечно-сосудистые расстройства, различные виды опухолей, нарушения иммунитета. Эти киназы обеспечивают образование бактериальных биопленок и поддержание толерантности и персистирования сложных популяций микроорганизмов. Таким образом поиск новых ингибиторов протеинкиназ важен для борьбы с заболеваниями человека. Нами разработаны методы синтеза ингибиторов протеинкиназ нового типа - аналогов известных ингибиторов класса бис(индол-3-ил)малеимидов. Скрининг на панели из 24-х протеинкиназ, относящихся как к серин-треониновым, так и к тирозиновым протеин киназам, а также на изоформах протеинкиназы С (Са, Сβ, Сγ) и ПКС-подобных серин-треониновых протеинкиназах бактерий привел к отбору ряда лидерных соединений. Отобранные лидерные вещества будут использованы как основа для создания нетоксичных, высокоселективных ингибиторов ПК для лечения опухолей человека и преодоления устойчивости бактерий к антибиотикам.

В.И. Казей¹, К.В. Балакин¹, С.Е. Ткаченко²

ОТКРЫТИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ PI3K СИГНАЛЬНЫХ КАСКАДОВ: НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В РАЗРАБОТКЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ

¹ЦВТ ХИМРАР, го Химки

²ChemDiv, Inc., США

В рамках оригинальной концепции «химическое разнообразие с точки зрения биологического эффекта» в компании КемДив разработан ряд фокусированных библиотек химических соединений, предназначенных для эффективного первичного поиска низкомолекулярных модуляторов специфических мишеней или клеточных каскадов. В настоящей презентации представлены результаты скрининга библиотеки соединений (5000 соединений/650 структурных хемотипов), «ортогонально» аннотированной по отношению к ряду мишеней. Аннотация включала в себя как «традиционные» (киназы, рецепторы, сопряженные с G-белками, ядерные рецепторы, ионные каналы и протеазы), так и «специальные» биологические мишени (сигнальные каскады и модуляторы динамики микротубулярных белков). С использованием концепции Focused Diversity™ удалось идентифицировать серии эффективных ингибиторов киназы PI3Kα специфического и двойного действия. Были получены два структурных хемотипа с высокой патентоспособностью, в ряду которых были обнаружены эффективные ингибиторы в клеточных и ферментных тестах (100-2000 нМ), с функциональной активностью в диапазоне 4-5 нМ при ингибировании киназы pAkt (ELISA). Селективность этих агентов по отношению к различным киназам составила: PI3Kβ > 50×; PI3Kδ, PI3Kγ > 10×; PKA и 20 других киназ > 100×. Были также получены важные экспериментальные *in vivo* показатели, относящиеся к фармакокинетике, токсичности, эффективности по отношению к клеточным линиям рака прямой кишки и опухолей груди.

Е.Л. Водовозова, Е.В. Моисеева, Г.П. Гаенко, Н.В. Бовин, Ю.Г. Молотковский

ПРИМЕНЕНИЕ ЛИПИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ В ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМАХ – МЕТОД УСИЛЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЭФФЕКТА ЛЕКАРСТВ

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Введение

Применяемые сегодня в клинике химиотерапевтические препараты обладают высокой общей токсичностью, что существенно ограничивает эффективность лечения онкологических больных. Включение лекарства в состав носителей-наночастиц, в том числе липосом, позволяет уменьшить его токсическое действие на организм в целом, в первую очередь, за счет уменьшения концентрации свободного препарата в кровотоке [1,2]. Кроме того, липосомы диаметра не более 100-150 нм способны накапливаться в опухолях и очагах воспаления благодаря эффекту пассивного транспорта, связанному с повышенной проницаемостью дефектных стенок капилляров [3,4]. Интерес к липосомам как системам доставки лекарств в последние годы возрос в связи с разработкой методов полу-

чения частиц, защищенных от опсонизации и преждевременного вывода из кровотока клетками ретикуло-эндотелиальной системы. Это достигается с помощью экранирования поверхности липосомы высокогидрофильными остатками полиэтиленгликоля (ПЭГ), которые ковалентно связаны с молекулами липидов, составляющих мембрану [5]. В результате получают так называемые Stealth®-липосомы, то есть липосомы, невидимые для клеток иммунной системы. Показано улучшение лечебного эффекта некоторых противоопухолевых антибиотиков, включенных в водный объем Stealth®-липосом [6]. К применению в клиниках США и стран ЕС допущен ряд препаратов; в производстве их используется метод активной загрузки (против градиента концентрации сульфата аммония) внутрь готовых липосом лекарств, имеющих катион-

ную липофильную структуру молекулы. Такая технология пригодна только для ограниченного числа лекарств, например, антрациклиновых антибиотиков. В первую очередь, это доксорубицин, на основе которого производится препарат Doxil® [6]. Альтернативный лабораторный способ – формирование липосом в водно-солевом растворе препарата с последующим отделением от невключившегося лекарства – нетехнологичен.

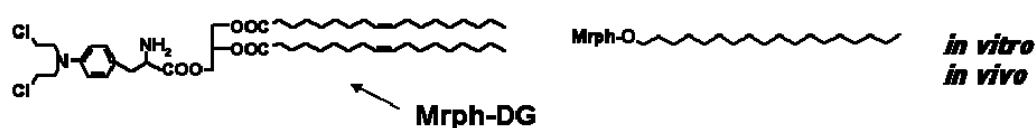
Мы предлагаем встраивать в липидный бислой липосом биodeградируемые липидные конъюгаты (липидные пролекарства, *lipophilic prodrugs*) широко применяемых в клинике препаратов [7,8], как правило, водорастворимых низкомолекулярных веществ, которые сами по себе удерживаться в мембране не могут. Включение пролекарств в мембрану липосом упрощает и делает универсальной технологию их приготовления. После вхождения в клетку липофильный остаток отщепляется внутриклеточными ферментами, высвобождая активный агент. Доставка цитотоксических препаратов в опухолевые клетки в виде липидных производных в составе липидного бислоя липосом дает ряд преимуществ: уменьшаются потери лекарства в кровотоке и при взаимодействии липосомы с клеткой; липидные производные способны к прямому трансмембранному переносу, который может кардинально изменить механизм эндоцитоза и внутриклеточного трафика препарата и облегчить разгрузку липосом. Для ускорения высвобождения лекарства из внутреннего объема Stealth®-липосом после их попадания в эндосомы клетки-мишени разработаны специальные молекулярные триггеры, например, пептидные [9]. Показано, что липидные производные ряда лекарств (Ага-С, фторурацила, цисплатина и др.), примененные в мицеллярной форме, обладают улучшенной фармакокинетикой [10]. Однако мицеллы безусловно проигрывают липосомам по таким параметрам как стабильность и фармакокинетика. Получен целый ряд N-ацильных и N-алкильных производных Ага-С [11-13], 5-фторуридина [14] и гемцитабина [15], которые в липосомальных формах превзошли по фармакокинетическим и противоопухолевым свойствам исходные препараты.

Липофильные производные противоопухолевых препаратов

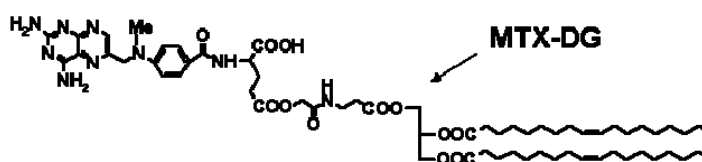
Мы синтезировали диглицеридные конъюгаты сарколизина, или D,L-мелфалана [7] (Mrph-DG), мелфалана (Mlph-DG), метотрексата (MTX-DG) [16,17] и рубомицина [8] на основе природного или синтетического гас-1,2-диолеоилглицерина (Рис.1). Конъюгаты предназначены для встраивания в липидный бислой липосом. Отметим, что только небольшая молекула типа сарколизина может надежно удерживаться в мембране липосомы с помощью моноалкильного липидного якоря. При разработке молекулярных структур было учтено, что связь между остатком лекарства и остальной частью молекулы должна легко гидролизываться внутри клетки-мишени. Поскольку эстеразы менее специфичны, чем пептидазы, предпочтительна сложноэфирная связь, а не амидная.

Мелфалан и его рацемат сарколизин — цитотоксические агенты алкилирующего типа, обладающие широким спектром противоопухолевого действия. Низкая стабильность при физиологических значениях pH и быстрое выведение из кровотока обуславливают

Мелфалан (Mrph , синонимы: сарколизин, D,L-мелфалан, D,L-алкеран)



Метотрексат
in vitro
in vivo



Рубомицин
in vitro

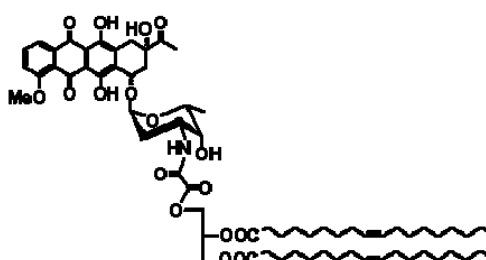


Рис. 1.

необходимость введения высоких концентраций этих агентов, что сопровождается множеством побочных эффектов. Описаны 1,3-дипальмитоилглицеридное [18] и 1,2-димиристоилглицеридное [19] производные мелфалана (L-сарколизина); в мицеллярной форме они показали пролонгированное действие и меньшую токсичность *in vivo*.

Цитостатик метотрексат (MTX, антиметаболит фолиевой кислоты) широко используется в клинике для лечения опухолей и аутоиммунных патологий, таких как ревматоидный артрит, где по сей день он остается «лекарством номер один» [20]. В настоящее время интенсивно исследуются возможности улучшения биораспределения MTX за счет применения наноносителей лекарств, в том числе конъюгатов MTX с полиамидными дендримерами [21], декстраном [22], желатином [23]. Эффективность лечения MTX ограничивается не только его системной токсичностью, но и частым развитием клеточной устойчивости (например, при острой лимфобластной лейкемии – до 30% случаев [24]), связанной, главным образом, с нарушением транспорта в клетку за счет мутаций и понижения активности белка, переносящего в клетку восстановленный фолат и аналогичные антифолаты (reduced folate carrier, RFC) [20]. Пассивный трансмембранный перенос молекулы MTX затруднен. Поэтому предложен целый ряд липофильных антифолатов, лишенных глутаматного остатка, которые способны диффундировать в клетку, минуя активный транспорт ([25] и цит. лит.); некоторые из этих препаратов нашли применение в клинике. Другой подход – липофильная модификация глутаматных карбоксилов MTX, позволяющая сохранить сродство к ферменту-мишени дигидрофолатредуктазе: в мицеллярных формах алифатические сложные эфиры [26] и амиды липоаминокислот [27] MTX были активны в культуре клеток лейкемии СЕМ/MTX, резистентных к MTX из-за дефектного RFC. Описан конъюгат MTX с фосфатидилэтаноламином (амидная связь по γ -COOH), который в липосомальной форме эффективно ингибировал коллаген-индуцированный артрит *in vitro* и *in vivo* [28].

Нами разработан синтез липофильного сложноэфирного производного MTX по γ -COOH (MTX-DG) [16,17]. Объемистый остаток MTX отделен от диглицеридного якоря короткой полярной вставкой, которая в липидном бислое располагается в зоне полярных головок фосфолипидов, что позволяет меньше нарушать упаковку бислоя и включать в липосомы больше лекарства. В составе липосом MTX-DG обнаружил цитотоксическую активность (в культуре клеток меланомы М3) [17]; очевидно, он высвобождает MTX за счет гидролиза внутриклеточными эстеразами, являясь пролекарством, либо непосредственно ингибирует дигидрофолатредуктазу.

Углеводные лиганды как молекулярные адреса для доставки липосом

Активный транспорт лекарств в опухоли достигается при включении в состав липосом молекулярных адресов, обладающих повышенным сродством к клеткам опухолевой ткани. Исследования проводятся по нескольким направлениям, в том числе: прививка на окончания ПЭГ-цепей на поверхности липосом фрагментов молекул гуманизированных моноклональных антител, которые селективно связываются с интернализуемыми рецепторами на опухолевых клетках, т.е. получение иммунолипосом; оснащение липосом остатком фолата и пр. [9]. Один из подходов основан на явлении повышенной экспрессии лектинов (специфических углеводов-связывающих белков) на поверхности клеток опухолей [29]. Исследования по адресной доставке лекарств с помощью полимерных или липосомальных носителей, оснащенных углеводными лигандами (обзор [30]), связаны, в основном, с транспортом в опухолевые клетки печени: хорошо изученные галактозо- и маннозоспецифические лектины гепатоцитов и купферовских клеток использованы как мишени для доставки *in vivo* лекарств и генов, заключенных в соответствующие адресные липосомы [31,32]. В качестве углеводных лигандов в мембрану липосом встраивали конъюгаты галактозы с аналогом холестерина [31] и холестерильные производные тиогалактозидов с полярными вставками (спейсерами) различной длины [32]. Исследуется ингибирование адгезии опухолевых клеток к сосудистому эндотелию (первый этап при метастазировании) с помощью липосом, несущих на своей поверхности тетрасахарид Sialyl Lewis X [33]. Возможная иммуногенность липосом, оснащенных низкомолекулярными лигандами, не подтверждается: липосомы, несущие липофильные конъюгаты маннозил-пептидов вызывали иммунный ответ *in vivo* только в присутствии адьюванта [34].

Оригинальность наших разработок состоит в том, что адресами липосом служат самые разнообразные углеводные структуры. Специфичность лектинов опухолей определяется путем скрининга связывания клеток с широким набором углеводных флуоресцентных зондов, представляющих собой конъюгаты на основе полиакриламида. Гибкая полимерная цепь позволяет углеводным остаткам подстраиваться для взаимодействия с множественными копиями лектинов на поверхности опухолевой клетки. Такие многоточечные, иначе называемые поливалентные, контакты необходимы для осуществления эффективного углевод-белкового взаимодействия. Нами проведены экспресс-анализы специфичности лектинов ряда опухолей человека и мыши: аденокарциномы легких человека и промиелоидных клеток HL-60 [35], мышшиной карциномы молочной железы [36], меланомы М3 [37]. Связывание зондов *in vitro* с клетками указанных опухолей в культурах оценивали, в основном, с помощью флуоресцентной микроскопии на качественном уровне, что более доступно при скрининге; иногда использовали цитофлуориметрию. Углеводные специфичности этих опухолевых клеток различны.

Конструирование адресных лекарственных липосом

Липосома является идеальным носителем углеводных лигандов, так как за счет латеральной диффузии в плоскости ее мембраны происходит концентрирование молекул гликоконъюгатов в зоне контакта с рецептором на поверхности клетки-мишени. Связывание с рецептором обеспечивается за счет экспонирования углеводных детерминант на достаточном расстоянии от мембраны с помощью полярных гибких вставок ПЭГ в молекуле гликоконъюгата между липофильным мембранным якорем и остатком углевода [38]. Показано *in vitro*, что при увеличении длины ПЭГ-вставки между остатком маннозы и алкильным мембранным якорем от 1 до 8 оксиэтильных звеньев интенсивность фагоцитоза купферовскими клетками липосом, оснащенных алкил-ПЭГ-маннозильным конъюгатом, резко возрастает [39]. В то же время, при дальнейшем наращивании остатка ПЭГ возрастает вероятность его изгиба в направлении поверхности липосомы [40]. Нами разработан оригинальный метод получения липофильных гликоконъюгатов: после выявления активных детерминант флуоресцентным зондированием, конъюгаты для встраивания в липосомы синтезируются на основе широкого набора аминопропилгликозидов и модифицированного коммерческого детергента Луброла РХ, представляющего собой простой эфир С18-алкила и остатка ПЭГ степени полимеризации 9–10 [8].

Основу липидного бислоя липосом составляют фосфолипиды, выделенные из природных источников — фосфатидилхолин из яичного желтка и фосфатидилинозит из пекарских дрожжей. Известно, что полярные группы фосфатидилинозита, введенного в состав мембраны в достаточном количестве (не менее 10 мол %), подобно ПЭГ-цепям создают высокогидратированную оболочку на поверхности липосомы и таким образом защищают ее от опсонизации и преждевременного вывода из кровотока клетками РЭС [41,42]. Мы полагаем, что такие липосомы не будут вызывать нежелательные побочные эффекты, в первую очередь, гиперемию, аллергические реакции, мукозит, которые сопутствуют применению Stealth®-липосом, несущих остатки ПЭГ-2000 (степень полимеризации 45–48) [43–45].

Метод получения липосом экструзией через поликарбонатные мембранные фильтры с калиброванными порами [46] — один из самых технологичных, именно он используется при производстве Stealth®-липосом. Гидратированная в забуференном физрастворе липидная пленка, приготовленная из смеси всех компонентов, подвергается 5–6 циклам замораживания (жидкий азот) — оттаивания (выше температуры фазового перехода липидного бислоя), а затем суспензия многократно (10–20 раз) продавливается через фильтры с порами диаметром 100 нм. При этом образуются готовые к использованию моноламеллярные (с единичным липидным бислоем) липосомы требуемого размера, несущие пролекарство (10 мол. %) и углеводный лиганд (2 мол. %). Дисперсии липосом содержат реле-

вантные для внутривенного введения животным концентрации лекарственного начала (~4 мМ).

Липидный бислой Stealth®-липосом формируется из фосфолипидов, содержащих насыщенные ацильные остатки (обычно дистеароилфосфатидилхолин или гидрогенизированный соевый лецитин), и холестерина (до 30%) с целью получения жестких мембран, которые меньше подвержены разрушению в кровотоке и утечке препарата из внутреннего объема [4–6]. Поэтому в ходе экструзии и активной загрузки лекарства (доксорибуцина) образцы нагревают до 60°C. В нашем случае липидные конъюгаты лекарств и углеводов сами являются компонентами мембраны и даже при ее повреждении не покидают липосому. Легкоплавкий (с низкой температурой фазового перехода) липидный бислой способен включить больше амфифильных молекул, не-компонентов матрицы бислоя. Кроме того, мембраны опухолевых клеток легче сливаются с жидкими липидными бислоями [47]. Поэтому основой наших липосом служат фосфолипиды, содержащие примерно половину насыщенных ацильных остатков (в основном, пальмитоильных и стеароильных), а остальные — ненасыщенные олеоильные и немного линолеоильных. Для приготовления малых объемов (≤ 1 мл) дисперсий липосомальных препаратов мы используем мини-экструдер Avantí (Канада). При проведении испытаний на животных, образцы препаратов (до 10 мл) удобно получать на установке фирмы Lixex (Канада), проводя экструзию под давлением азота (до 50 атм).

Электронные микрофотографии поверхностей скола лекарственных липосом, полученные через сутки после приготовления дисперсий, показывают, что частицы представляют собой моноламеллярные (то есть с одним липидным бислоем) везикулы размером 50–100 нм (Рис. 2).

Взаимодействие адресных липосом с опухолевыми клетками *in vitro*

Нами в опытах *in vitro* показано, что цитотоксическая активность адресных липосом с диглицеридными конъюгатами сарколизина и метотрексата примерно в 2–4 раза выше, чем лекарственных липосом без углеводных лигандов [35,17]. Так, для клеток меланомы М3 в среде, содержащей липосомы с МТХ-DG и неактивным контрольным пентаолом, выживаемость выше, чем в случае лекарственных липосом, оснащенных А-трисахаридом (Atri) или тетрасахаридом Sialyl Lewis X (SiaLe^X): значения IC_{50} для контрольных, Atri- и SiaLe^X-липосом составили 1.2 ± 0.4 , 0.8 ± 0.2 и 0.4 ± 0.1 мкМ, соответственно (цитотоксическую активность определяли стандартным для антифолатов тестом с трипановым синим [25–27]).

Механизм внутриклеточного транспорта и метаболизма липофильных пролекарств нами пока не изучен. Вероятнее всего, сначала эстеразы отщепляют диглицеридные остатки и только после этого лекарства осуществляют свое специфическое цитотоксическое действие, что вносит вклад в увеличение зна-

А, а — липосомы с MTX-DG Б, б — липосомы с Mrph-DG

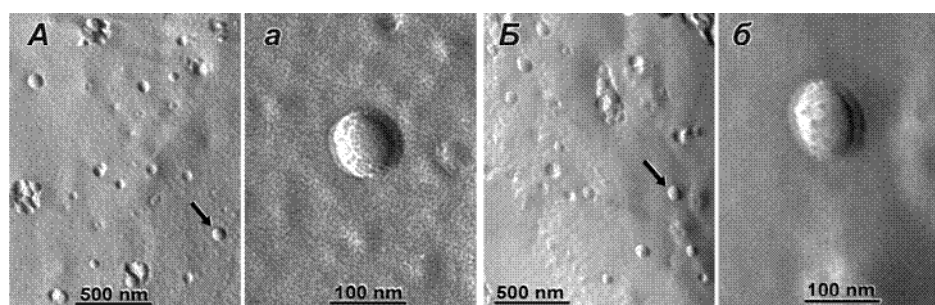


Рис.2. Электронные микрофотографии реплик с поверхностей скола замороженных дисперсий лекарственных липосом (freeze-fracture)

чения IC_{50} для MTX-DG в липосомальных формах, по сравнению с исходным лекарством (для MTX $IC_{50} \sim 0.08$ мкМ). В экспериментах *in vitro* значительное ослабление цитотоксичности препаратов при включении их в разнообразные наночастицы связано как с изменением механизма эндоцитоза, так и с необходимостью разгрузки носителя внутри клетки. При системном введении в организм включается множество других факторов, влияющих на экспозицию опухолевых клеток для действия лекарств. Среди них принципиально важными являются время циркуляции в кровотоке и возможность накопления в опухолевой ткани.

Внутриклеточный транспорт и метаболизм лекарства зависят от механизма эндоцитоза носителя. По данным конфокальной микроспектрофлуориметрии (confocal spectral imaging technique), эндоцитоз адресных липосом происходит примерно в 1.5 раза быстрее, чем контрольных [37].

Через 30 мин инкубации клеток меланомы М3 с липосомами, меченными по липидному бислою флуоресцентным фосфолипидным зондом, в случае контрольных липосом метка распределена, в основном, в мембране и прилегающей к ней части цитоплазмы, а в случае адресных она проникает в цитоплазму и околоядерное пространство существенно сильнее. Видна диффузная флуоресценция. Возможно, адресные липосомы попадают в клетку за счет так называемого адсорбционного эндоцитоза, когда сродство обеспечивается множественными взаимодействиями с лектинами. При этом молекулы связанных везикул становятся компонентами плазматической мембраны и подвергаются метаболизму как ее часть. Обычно неспециализированные клетки каждый час интернализуют эквивалент собственной поверхности. Мы полагаем, что наши адресные липосомы минуют эндосомалитический путь интернализации, и проблема внутриклеточной разгрузки отсутствует.

Испытания противоопухолевой активности адресных липосом

Таким образом, в экспериментах *in vitro* при оснащении лекарственных липосом углеводными адресами наблюдались умеренные эффекты усиления ци-

тотоксической активности. При этом существенное улучшение противоопухолевого действия показано на нескольких моделях экспериментальных животных. Пока нами не выяснено, действуют ли адресные липосомы непосредственно на злокачественные клетки или влияют на какие-то другие компоненты опухолевой ткани. Приведем кратко результаты испытаний противоопухолевой активности *in vivo*.

Лейкоз Р-388. При лечении мышей с экспериментальным лейкозом Р-388 липосомами, несущими диглицеридный конъюгат сарколизина (DG-Mrph), увеличение продолжительности жизни (УПЖ) по сравнению с применением интактного сарколизина состави-

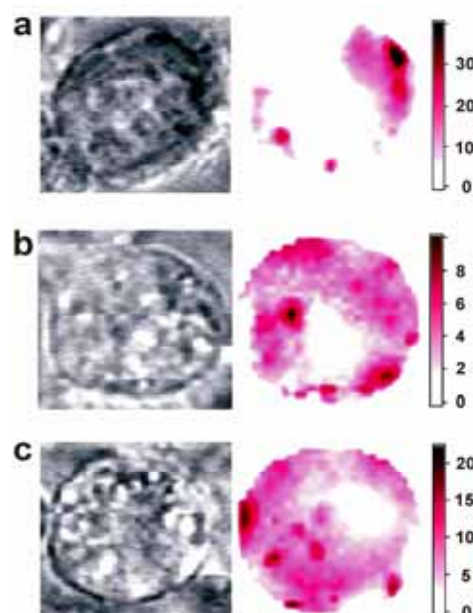


Рис. 3. Взаимодействие липосом с опухолевыми клетками *in vitro*:

Распределение флуоресценции родамина в клетках меланомы М3 после 30-мин инкубации с контрольными (а), А-трисахаридными (б), или SiaLeX-липосомами (с).

ла 1.4 раза; добавление в липосомы углеводных лигандов увеличило этот показатель до значений 1.9 (альфа-L-фукоза) и 2.2 (бета-N-ацетилгалактозамин) [48]. Мышам BDF1 ($n = 6$ в каждой группе) через 48 ч после трансплантации клеток лейкоза и повторно через 72 ч вводили внутривенно тестируемые вещества в дозах (в пересчете на сарколизин) 7.0 (~1 мл), 3.5 и 0.7 мг/кг. Контрольные животные получали по 1 мл забуференного фосфатами физраствора (PBS, pH 7.0).

Экспериментальный рак молочных желез. В качестве модели рака молочных желез нами были использованы мыши линии BLRB-Rb(8.17)11em, характеризующейся высокой частотой (более 95%) спонтанного возникновения опухоли молочных желез с последующим неизбежным метастазированием в легкие. Были сконструированы липосомы, нагруженные октадецильным производным мерфалана и несущие липофильный конъюгат тетрасахарида SiaLe^x [36].

Для первичных испытаний препаратов спонтанные опухоли не подходят вследствие крайней неоднородности материала (многопараметровые различия между самками-реципиентами). Регулярно перевиваемые стандартные опухолевые штаммы мало отражают реалии ракового процесса, возникшего естественным путем (высокая скорость роста и неадекватность кровоснабжения). Рациональной является модель первой перевивки опухолевых клеток из быстрорастущей спонтанной мышшиной карциномы молочных желез самки BLRB самцам BLRB. Это дает возможность зафиксировать минимальное влияние исследуемого препарата, как на процесс проявления пальпируемых опухолевых узелков, так и на последующий рост видимых глазом опухолей. Для перевивки были использованы реципиенты-самцы линии BLRB в возрасте 4.5 ± 0.5 мес. У самок в возрасте 4-6 месяцев могут спонтанно возникать карциномы, которые трудно отличить от перевитых опухолей.

Оценивали влияние препаратов на рост карциномы молочных желез и продолжительность жизни мышшей ($n = 10$ в каждой группе) после *i.v.* введения в хвостовую вену в дозе (в пересчете на интактный сарколизин) 7.0 мг/кг на 3-й и повторно на 7-й день после подкожной инокуляции клеток карциномы. Контрольные животные получали по 0.5 мл PBS вместо сарколизина или липосомальных препаратов. Эффективность подавления роста опухоли резко возрастала при включении производного мерфалана в липосомы, оснащенные SiaLe^x.

Лечебный эффект адресных липосом ярко виден на графике динамики выживания (Рис.4). Мыши, получавшие пустые липосомы или оснащенные SiaLe^x, жили примерно столько же, сколько и контрольные (черная линия). Небольшое увеличение выживания показал интактный мерфалан (красная линия). Лекарственные липосомы без SiaLe^x дали существенное улучшение выживания (голубая линия), но самыми эффективными оказались адресные липосомы (зеленая линия) [36].

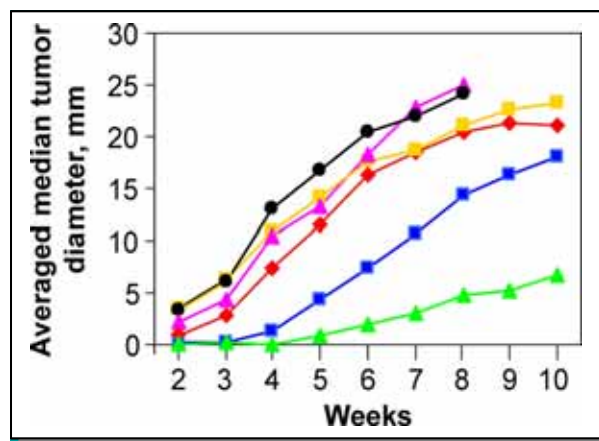


Рис. 4. Динамика роста среднего размера опухоли у мышшей линии BLRB-Rb(8.17)11em с имплантированной карциномой молочных желез в различных экспериментальных группах

Спонтанный рак молочных желез. Нами проведены испытания противоопухолевой активности липосомальных препаратов диглицеридного производного мерфалана (Mrph-DG) на мышшах BLRB со спонтанными карциномами молочной железы. Липосомы нагружали Mrph-DG и использовали SiaLe^x-конъюгаты, имеющие различные мембранные якоря: однопочечный (Conjugate I) и новый, диглицеридный (Conjugate II), который надежнее удерживает конъюгат в мембране (Рис. 5).

При создании базы данных по росту спонтанных опухолей и выживанию самок BLRB (116 особей) было установлено, что животных можно разделить минимум на две категории: I – с быстрорастущими опухолями, ~72 % популяции, диаметр опухоли ~20 мм перед смертью, средняя продолжительность жизни 53 ± 3 дня; II – с медленно растущими опухолями, ~28 % популяции, опухоли сохраняют диаметр не более 4-5 мм в течение 2-х недель и более (лаг-период) с последующим скачкообразным ускорением роста, но меньшим конечным размером в сравнении с опухолями I группы, средняя продолжительность жизни 77 ± 5 дней.

Поскольку не представлялось возможным готовить и вводить липосомальные препараты отдельно для каждой особи после определения, к какой категории она относится, для адекватной интерпретации данных в экспериментальных группах оба изучаемых параметра (динамика роста опухоли и продолжительность жизни для каждой особи) отсчитывались от момента визуального обнаружения, когда опухоль достигала 4-5 мм. В этот день начиналось лечение: препараты (по 0.2 мл, 7 мг/кг по мерфалану) вводили в хвостовую вену 2 раза с интервалом в 3 дня.

Анализ кривых среднего роста опухолей с 3-й по 5-ю неделю после их визуального обнаружения показал, что лучше всего замедляли рост опухолей лекарственные липосомы с однопочечным SiaLe^x-

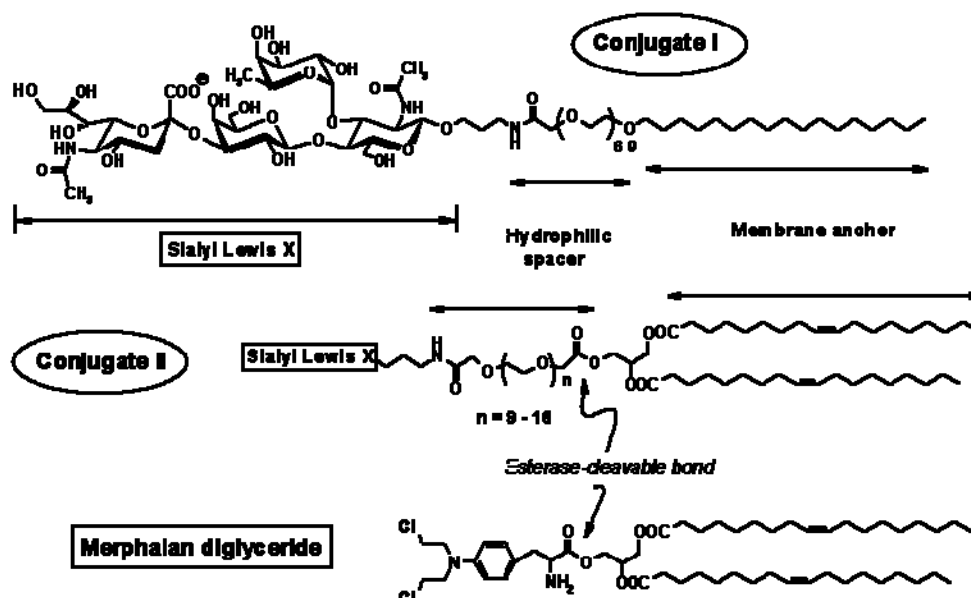


Рис. 5. Структуры SiaLeX-конъюгатов (I) и (II), и липидного производного мерфалана

конъюгатом (8 самок). Возможно, такой результат обусловлен большей стабильностью данного глико-конъюгата (Conjugate I) *in vivo*, так как простая эфирная связь между мембранным якорем и остальной частью молекулы не подвержена гидролизу.

В группе 3 наблюдалось также улучшение выживаемости на отдаленных сроках: к 20 неделе эксперимента выжило большее число животных. Отметим, что мыши, получавшие интактный мерфалан выживали существенно хуже и на более ранних сроках, возможно, из-за большей токсичности свободного лекарства.

Вскрытие особей с долгим выживанием выявило следующие закономерности: 1) в контроле количество видимых опухолевых узелков в легких возрастало по мере увеличения продолжительности жизни; 2) у животных, леченных липосомами с конъюгатами SiaLe^X, легкие практически не содержали видимых опухолевых узелков. Можно предположить, что улучшение выживания в этих случаях вызвано не только и не столько отторжением первичной опухоли, сколько предупреждением метастазирования.

Т-лимфолейкоз. Недавно нами проведена первая серия испытаний противоопухолевых свойств липосом, нагруженных MTX-DG, на перевиваемой модели Т-лимфолейкоза мышей A/Sn. Для получения адресных липосом вновь был использован лиганд SiaLe^X (в виде одноцепочечного липофильного конъюгата I). Этот углевод является лигандом селектинов, семейства лектинов, которые повышенно экспрессируются на поверхности лейкоцитов и клеток эндотелия в ходе ангиогенеза в опухолях. Высокое сродство к SiaLe^X проявляют селектины всех трех типов: E- (экспрессирован на эндотелиальных клетках), L- (на лейкоцитах) и P- (на тромбоцитах). Наличие селектинов на поверхности клеток лимфомы было подтверждено с помощью цитофлуориметрии. Противоопухолевый эф-

фект оценивали по ингибированию роста опухоли и увеличению продолжительности жизни (УПЖ) реципиентов с подкожной лимфомой и системным лейкозом. Препараты вводили *i.v.* в хвостовую вену на 3, 5, 10 и 12 сутки после подкожной перевивки опухоли. Во всех леченных группах наблюдалось достоверное ингибирование подкожного роста опухоли.

По сравнению с нелеченной контрольной группой ($n = 3$) лечение метотрексатом ($n = 5$) дало УПЖ на 23%, липосомами с MTX-DG ($n = 6$) – на 29%, а адресными липосомами с MTX-DG ($n=6$) – на 43 %, причем все различия достоверны. Таким образом, лечение мышей MTX-липосомами уже показало УПЖ на 6% по сравнению с интактным метотрексатом, а при лечении адресными липосомами этот показатель увеличился до 17%. Интересно отметить, что лечение адресными липосомами при сходном уровне ингибирования подкожного роста опухоли мышей, леченных простыми MTX-липосомами, привело к выраженному улучшению выживания. Мы полагаем, что усиление противоопухолевого эффекта адресных липосом, несущих лиганды к селектинам, произошло вследствие их действия не только на рост подкожной лимфомы, но и на лейкоэмическую составляющую, собственно и приводящую к гибели реципиентов. Очевидно также, что путем подбора режимов введения липосомальных препаратов (дозы, кратность) можно существенно улучшить результаты лечения.

Преодоление лекарственной устойчивости опухолевых клеток путем липофильной модификации препаратов

Как отмечалось выше, эффективность применения метотрексата ограничивается быстрым развитием устойчивости, связанной, в первую очередь, с нарушением трансмембранного переноса. Мы проверили,

позволяет ли липофильная модификация преодолеть такую устойчивость опухолевых клеток. С этой целью было проведено сравнительное определение цитотоксической активности липосом с MTX-DG *in vitro* в культурах клеток лейкемии человека с различной чувствительностью к MTX: Т-лимфобластной линии СЕМ-CCRF и сублинии СЕМ/MTX, устойчивой к MTX из-за дефицита RFC. Для интактного MTX IC_{50} составила 16.4 ± 4.9 и 0.075 ± 0.005 мкМ в культурах СЕМ/MTX и СЕМ-CCRF, соответственно; для липосом с MTX-DG – 1.68 ± 0.05 и 0.88 ± 0.07 мкМ (приведены средние данные трех независимых экспериментов, каждый в двух повторах). Следовательно, резистентность (отношение IC_{50} СЕМ/MTX к IC_{50} СЕМ-CCRF) уменьшилась от значения 218 для MTX до 1.9 для липосомальной формы MTX-DG (в 114 раз), при этом цитотоксическая активность мало отличается от таковой в среде чувствительных клеток родительской линии.

Получение липосомальных препаратов длительного хранения

Что касается устойчивости липосомальных препаратов, то дисперсии могут храниться без существенной агрегации липосом несколько дней. Однако сами лекарства, в особенности, сарколизин, в физиологическом растворе постепенно деградируют. С целью получения препаратов длительного хранения, мы исследовали с помощью электронной микроскопии (метод негативного контрастирования) размеры и степень агрегации липосом в ходе замораживания (жидкий азот)/хранения при -70°C /размораживания. Липосомы, содержащие производное Mph, после размораживания частично агрегируют с образованием крупных плотных конгломератов, которые диспергируются до исходных частиц кратковременной обработкой на ультразвуковой бане. Напротив, MTX-липосомы, при размораживании не образуют плотных агрегатов, что может объясняться наличием отрицательного заряда α -карбоксила метотрексата на поверхности липосом.

Очевидно, что липидные производные лекарств и углеводов при замораживании/размораживании не могут покинуть липидный бислой, в отличие от растворенных во внутреннем объеме лекарств. Состав липосом до и после замораживания/размораживания и ультразвуковой обработки определяли с помощью гель-хроматографии с последующим анализом фракций после разрушения липосом этанолом: фосфолипиды определяли элементным анализом на фосфор с помощью колориметрического метода [49], конъюгаты Mph и MTX – спектрофотометрически (MTX-DG: $\lambda_{\text{макс.}}$ = 302 нм, ϵ ~25000; Mph-DG: $\lambda_{\text{макс.}}$ = 258 нм, ϵ ~19700). Показано, что выделения MTX-DG из липидного бислоя липосом в отдельные агрегаты не происходит. Аналогичные данные получены и для Mph-DG (график не приведен). Таким образом, состав и размер липосом, нагруженных липидными производными лекарств, не менялся при хранении липосом (после заморажива-

ния в жидком азоте) в замороженном виде при -70°C с последующим размораживанием и обработкой на ультразвуковой бане. Следовательно, такой метод может применяться для длительного хранения липосомальных препаратов.

Заключение

Показано, что включение известных химиотерапевтических средств – мелфалана/сарколизина и метотрексата – в виде липофильных пролекарств в мембрану липосом-носителей позволяет существенно улучшить их противоопухолевые свойства. Добавление в конструкцию липосом специфических липофильных гликоконъюгатов приводит к усилению эффекта. Предложен вариант получения липосомальных препаратов длительного хранения. В дальнейшем необходимо исследовать фармакокинетику и биораспределение липосомальных препаратов, а также механизм их противоопухолевого действия.

Исследования проведены при поддержке гранта-ми РФФИ № 97-04-48421, № 00-04-48922, № 03-04-48396, № 06-04-49432, МНТЦ № 1781, ФЦП Миннауки РФ: государственный контракт № 02.513.11.3089, лот 2007-3-1.3-22-01-584.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lasic D.D., Papahadjopoulos D. Liposomes revisited // Science. — 1995. — Vol. 267, № 5202. — P. 1275-6.
2. Couvreur P., Vauthier C. Nanotechnology: intelligent design to treat complex disease // Pharm. Res. — 2006. — Vol. 23, №7. — P. 1417-50.
3. Yuan F., Dellian M., Fukumura D.F., Leunig M., Berk D.A., Torchilin V.P., Jain R.K. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size // Cancer Res. — 1995. — Vol. 55, № 17. — P. 3752-6.
4. Straubinger R.M., Arnold R.D., Zhou R., Mazurchuk R., Slack J.E. Antivascular and antitumor activities of liposome-associated drugs // Anticancer Res. — 2004. — Vol. 24, № 2A. — P. 397-404.
5. Woodle M.C., Lasic D.D. Sterically stabilized liposomes // Biochim. Biophys. Acta. — 1992. — Vol. 1113, № 2. — P. 171-99.
6. Gabizon A., Schmeeda H., Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin: a review of animal and human studies // Clin. Pharmacokinet. — 2003. — Vol. 42, № 5. — P. 419-36.
7. Водовозова Е.Л., Никольский П.Ю., Михалев И.И., Молотковский Ю.Г. Липидные производные сарколизина, метотрексата и рубомицина // Биоорганическая химия. — 1996. — Т. 22, № 7. — С. 548-56.
8. Водовозова Е.Л., Хайдуков С.В., Гаенко Г.П., Бондарчук Т.И., Михалев И.И., Гречишников И.В., Молотковский Ю.Г. Транспортировка цитотоксических липосом к злокачественным клеткам с помощью углеводных детерминант // Биоорганическая химия. — 1998. — Т. 24, № 10. — С. 760-7.

9. *Sapra P., Allen T.M.* Ligand-targeted liposomal anticancer drugs // *Prog. Lipid Res.* — 2003. — V. 42, № 5. — P. 439-62.
10. *Wong A., Toth I.* Lipid, sugar and liposaccharide based delivery systems // *Curr. Med. Chem.* — 2001. — V. 8, № 9. — P. 1123-36.
11. *Rubas W., Supersaxo A., Weder H.G., Hartmann H.R., Hengartner H., Schott H., Schwendener R.* Treatment of murine L1210 lymphoid leukemia and melanoma B16 with lipophilic cytosine arabinoside prodrugs incorporated into unilamellar liposomes // *Int. J. Cancer.* — 1986. — Vol. 37, № 1. — P. 149-54.
12. *Tokunaga Y., Iwasa T., Fujisaki J., Sawai S., Kagayama A.* Liposomal sustained-release delivery systems for intravenous injection. IV. Antitumor activity of newly synthesized lipophilic 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine prodrug-bearing liposomes // *Chem. Pharm. Bull.* — 1988. — Vol. 36, № 9. — P. 3574-83.
13. *Schwendener R.A., Schott H.J.* Lipophilic 1-beta-D-arabinofuranosyl cytosine derivatives in liposomal formulations for oral and parenteral antileukemic therapy in the murine L1210 leukemia model // *Cancer Res. Clin. Oncol.* — 1996. — Vol. 122, № 12. — P. 723-6.
14. *Crosasso P., Brusa P., Dosio F., Arpicco S., Pacchioni D., Schuber F., Cattel L.* Antitumoral activity of liposomes and immunoliposomes containing 5-fluorouridine prodrugs // *J. Pharm. Sci.* — 1997. — Vol. 86, № 7. — P. 832-9.
15. *Immordino M.L., Brusa P., Rocco F., Arpicco S., Ceruti M., Cattel L.* Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs // *J. Control. Release.* — 2004. — Vol. 100. — P. 331-46.
16. *Водовозова Е.Л., Евдокимов Д.В., Молотковский Ю.Г.* Синтез липидного производного противоопухолевого препарата метотрексата // *Биоорганическая химия.* — 2004. — Т. 30, № 6. — С. 663-5.
17. *Водовозова Е.Л., Гаенко Г.П., Бобрикова Е.С., Пазынина Г.В., Молотковский Ю.Г.* Диглицеридное производное метотрексата: синтез и цитотоксическая активность в составе адресных липосом // *Хим.-Фарм. журн.* — 2007. — Т. 41, № 6. — С. 10-4.
18. *Loiseau P.M., Deverre J.R., el Kihel L., Gayral P., Letourneau Y.* Study of lymphotropic targeting and macrofilaricidal activity of a melphalan prodrug on the *Molnema dessetae* model // *J. Chemother.* — 1994. — Vol. 6, № 4. — P. 230-7.
19. *Morris A.D., Atassi G., Guilboud N., Cordi A.A.* The synthesis of novel melphalan derivatives as potential antineoplastic agents // *Eur. J. Med. Chem.* — 1997. — V. 32, № 3 — P. 343-9.
20. *McGuire J.J.* Anticancer antifolates: current status and future directions // *Curr. Pharm. Design.* — 2003. — Vol. 9, № 31. — P. 2593-613.
21. *Gurdag S., Khandare J., Stapels S., Matherly L.H., Kannan R.M.* Activity of dendrimer-methotrexate conjugates on methotrexate-sensitive and -resistant cell lines // *Bioconjugate Chem.* — 2006. — Vol. 17, № 2. — P. 275-83.
22. *Chau Y., Dang N.M., Tan F.E., Langer R.* Investigation of targeting mechanism of new dextran-peptide-methotrexate conjugates using biodistribution study in matrix-metalloproteinase-overexpressing tumor xenograft model // *J. Pharm. Sci.* — 2006. — Vol. 95, № 3. — P. 542-51.
23. *Ofner C.M., Pica K., Bowman B.J., Chen C.S.* Growth inhibition, drug load, and degradation studies of gelatin/methotrexate conjugates // *Int. J. Pharm.* — 2006. — Vol. 308, № 1-2. — P. 90-9.
24. *Pui C.-H.* Childhood leukemias // *N. Engl. J. Med.* — 1995. — Vol. 332, № 24. — P. 1618-30.
25. *Bram E., Ifergan I., Shafran A., Berman B., Jansen G., Assaraf Y.G.* Mutant Gly482 and Thr482 ABCG2 mediate high-level resistance to lipophilic antifolates // *Cancer Chemother. Pharmacol.* — 2006. — Vol. 58, № 6. — P. 826-34.
26. *Rosowsky A., Forsch R.A., Yu C.-S., Lazarus H., Beardsley G.P.* Methotrexate analogues. 21. Divergent influence of alkyl chain length on the dihydrofolate reductase affinity and cytotoxicity of methotrexate monoesters // *J. Med. Chem.* — 1984. — Vol. 27, № 5. — P. 605-9.
27. *Pignatello R., Spampinato G., Sorrenti V., Di Giacomo C., Vicari L., McGuire J.J., Russell C.A., Puglisi G., Toth I.* Lipophilic methotrexate conjugates with antitumor activity // *Eur. J. Pharm. Sci.* — 2000. — Vol. 10, № 3. — P. 237-45.
28. *Williams A., Goodfellow R., Topley N., Amos N., Williams B.* The suppression of rat collagen-induced arthritis and inhibition of macrophage derived mediator release by liposomal methotrexate formulations // *Inflam. Res.* — 2000. — Vol. 49, № 4. — P. 155-61.
29. *Gabius H.J.* Tumor lectinology: at the intersection of carbohydrate chemistry, biochemistry, cell biology, and oncology // *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* — 1988. — Vol. 27, № 10. — P. 1267-76.
30. *Bies C., Lehr C.-M., Woodley J.F.* Lectin-mediated drug targeting: history and applications // *Adv. Drug Deliv. Revs.* — 2004. — Vol. 56, № 4. — P. 425-35.
31. *Managit C., Kawakami S., Nishikawa M., Yamashita F., Hashida M.* Targeted and sustained drug delivery using PEGylated galactosylated liposomes // *Int. J. Pharm.* — 2003. — Vol. 266, № 1-2. — P. 77-84.
32. *Sun X., Hai L., Wu Y., Hu H.Y., Zhang Z.R.* Targeted gene delivery to hepatoma cells using galactosylated liposome-polycation-DNA complexes (LPD) // *J. Drug Targeting.* — 2005. — Vol. 13, № 2. — P. 121-8.
33. *Zeisig R., Stahn R., Wenzel K., Behrens D., Fichtner I.* Effect of sialyl Lewis X-glycoliposomes on the inhibition of E-selectin-mediated tumour cell adhesion in vitro // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes.* — 2004. — Vol. 1660, № 1-2. — P. 31-40.
34. *White K., Rades T., Kearns P., Toth I., Hook S.* Immunogenicity of liposomes containing lipid core peptides and the adjuvant Quil A // *Pharm. Res.* — 2006. — Vol. 23, № 7. — P. 1473-81.
35. *Vodovozova E.L., Gayenko G.P., Razinkov V.I., Korchagina E.Y., Bovin N.V., Molotovskiy J.G.* Saccharide-assisted delivery of cytotoxic liposomes to human

malignant cells // Biochem. Mol. Biol. Int. — 1998. — Vol. 44, №3. — P. 543-53.

36. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K., Gayenko G.P., Nifant'ev N.E., Bovin N.V., Molotkovsky J.G. Antitumour activity of cytotoxic liposomes equipped with selectin ligand SiaLeX, in a mouse mammary adenocarcinoma model // Eur. J. Cancer. — 2000. — Vol. 36, № 7. — P. 942-49.

37. Водовозова Е.Л., Назарова А.И., Феофанов А.В., Холоденко Р.В., Пазынина Г.В., Гаенко Г.П., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г. Взаимодействие липосом, несущих углеводные детерминанты, с клетками меланомы // Биол. Мембраны. — 2004. — Т. 21, №1. — С. 53-64.

38. Shimada K, Kamps JA, Regts J, Ikeda K, Shiozawa T, Hirota S, Scherphof GL. Biodistribution of liposomes containing synthetic galactose-terminated diacylglycerol-poly(ethyleneglycol)s // Biochim Biophys Acta. — 1997. — Vol. 1326, № 2. — P. 329-41.

39. Engel A., Chatterjee S.K., Alarifi A. Influence of spacer length on interaction of mannosylated liposomes with human phagocytic cells // Pharm. Res. — 2003. — Vol. 20, № 1. — P. 51-7.

40. Engel A., Chatterjee S. K., Alarifi A., Nuhn P. Influence of spacer length on the agglutination of glycolipid-incorporated liposomes by ConA as model membrane // J. Pharm. Sci. — 2003. — Vol. 92, № 11. — P. 2229-35.

41. Gabizon A., Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1988. — Vol. 85, № 18. — P. 6949-53.

42. Muller M., Zschornig O., Ohki S., Arnold K. Fusion, leakage and surface hydrophobicity of vesicles containing phosphoinositides: influence of steric and electrostatic effects // J. Membrane Biol. — 2003. — Vol. 192, №1. — P. 33-43.

43. Laverman P, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM, Storm G. In vivo applications of PEG liposomes: unexpected observations // Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. — 2001. — Vol. 18, № 6. — P. 551-66.

44. Moghimi S.M., Hamad I., Andresen T.L., Jorgensen K., Szebeni J. Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipids-methoxy (Polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production // Faseb J. — 2006. — Vol. 14. — P. U293-U303.

45. Romberg B., Metselaar J.M., Baranyi L., Snel C.J., Bunger R., Hennink W.E., Szebeni J., Storm G. Poly(amino acid)s: promising enzymatically degradable stealth coatings for liposomes // Int. J. Pharm. — 2007. — Vol. 331, № 2. — P. 186-9.

46. Olson F., Hunt C.A., Szoka F.C., Vail W.J., Papahadjopoulos D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes // Biochim. Biophys. Acta. — 1979. — Vol. 557, № 1. — P. 9-23.

47. Funaki N.O., Tanaka J., Kohmoto M., Sugiyama T., Ohshio G., Nonaka A., Yotsumoto F., Takeda Y., Imamura M. Membrane fluidity correlates with liver cancer cell proliferation and infiltration potential // Oncol. Rep. — 2001. — Vol. 8, № 3. — P. 527-32.

48. Козлов А.М., Корчагина Е.Ю., Водовозова Е.Л., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г., Сыркин А.Б. Усиление противоопухолевой активности сарколизина путем превращения его в липидное производное и включения в мембрану липосом, содержащих углеводный вектор // Бюлл. экпер. биол. мед. — 1997. — Т. 123, № 4. — С. 439-41.

49. Bartlett G.R. Phosphorus assay in column chromatography // J. Biol. Chem. — 1959. — Vol. 234, № 3. — P. 466-8.

НОВЫЕ БИОМИШЕНИ ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ И ТЕСТ-СИСТЕМЫ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

А. Куимов

ФЕРМЕНТЫ СЕМЕЙСТВА PARP КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВ

НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ, Москва

Поли-ADP-рибозилирование – один из способов посттрансляционной модификации белков, который клетка использует в механизмах защиты ДНК от повреждений, для регуляции митоза и других жизненно важных процессов. К ферментам семейства PARP (поли-ADP-рибоза-полимераз) относят 17 белков, закодированных в геноме человека. Среди них наиболее изученными являются PARP-1, активируемая разрывами ядерной ДНК, и танкиразы, два сигнальных белка, локализованных в различных клеточных компартментах. Все ферменты этого семейства используют NAD^+ для синтеза поли-ADP-рибозы, ковалентно связанной с рядом специфических белковых субстратов. В нашей и зарубежных лабораториях изоэнзим танкираза-2 человека был клонирован как опухолевый антиген. Этот фермент в норме экспрессируется в клетках эпителия почечных канальцев и в некоторых других типах дифференцированных клеток. Танкираза-2 обнаружена нами также в 20-30% исследованных опухолей молочной железы, а ферментативная активность одной или обеих танкираз повышена во всех исследованных опухолевых клетках. Функция танкиразы состоит в регуляции длины теломер ДНК, расхождения хромосом при митозе и некоторых других процессов. Ингибиторы танкиразы и других ферментов семейства PARP могут найти применение при лечении многих заболеваний, в том числе онкологических.

Несмотря на широкую известность PARP-1 в связи с расщеплением этого фермента при апоптозе, семейство PARP до сих пор мало привлекало внимание отечественных ученых. Его изучение началось в конце прошлого века, когда в связи с сокращением финансовой базы российской науки новые объекты исследования практически перестали интересовать сокрощаемые институты и лаборатории нашей страны. В международных журналах обширная литература по этой теме была обобщена в ряде обзоров [1-9].

Поли-ADP-рибоза-полимеразы (PARP) катализируют одну из реакций посттрансляционной модификации белка, поли-ADP-рибозилирование. В ходе этой реакции молекула NAD^+ подвергается необратимому расщеплению, в ходе которого никотинамид освобождается в раствор, а остаток ADP-рибозы используется для полимеризации. Никотинамид является не только одним из продуктов, но и конкурентным ингибитором реакции. На основе никотинамида или бензамида синтезируют значительную часть эффекторов ферментов семейства PARP [7].

Различают два основных типа ферментов, катализирующих ADP-рибозилирование: моно-ADP-рибоза-полимеразы и поли-ADP-рибоза-полимеразы. Примером моно-ADP-рибоза-полимераз является холерный токсин (КФ 2.4.2.31). Все известные поли-ADP-

рибоза-полимеразы (КФ 2.4.2.30) относятся к одному семейству с гомологичным каталитическим PARP доменом. Первым ферментом этого семейства была описана PARP-1 [10, 11]. Известна пространственная структура этого фермента и его отдельных доменов. Основная (но не единственная) функция PARP-1 состоит в регуляции репарации, поэтому фермент активируется поврежденной ДНК.

Для синтеза каждой молекулы NAD^+ , затрачиваемой в качестве одного из субстратов ферментами семейства PARP, используется четыре молекулы АТФ. Если PARP активирована слишком долго, то клетка гибнет от истощения запасов макроэргов, что вызывает некроз тканей. Поэтому ингибиторы PARP с успехом применяют для лечения патологических процессов, в которых происходит повреждение и активируется репарация ДНК. Конечно, ингибиторы не могут предотвратить гибель клеток из-за повреждения ДНК, она может быть только отсрочена, но вместо острого некроза происходит медленная и постепенная замена гибнущих клеток, позволяющая сохранить целостность ткани. К тому же сам процесс гибели клетки происходит в виде апоптоза, а не некроза, что существенно смягчает негативные последствия отмирания части клеток для организма в целом.

Среди патологических процессов, лечение которых возможно с использованием ингибиторов PARP, можно перечислить последствия ионизирующего облучения, ишемии, воспаления, а также аутоиммунные заболевания и диабет [6, 7, 9].

Важность ингибирования PARP-1 в процессе гибели клетки подтверждается и тем, что в процессе эволюции появился специальный механизм протеолитической деградации этого фермента, который включается, когда клетка инициирует апоптоз. В ходе апоптоза происходит рестрикция ДНК, и если бы к этому моменту в клетке присутствовала каталитически активная PARP-1, то был бы запущен механизм репарации с неизбежной затратой энергии и последующим некрозом.

Еще до открытия остальных ферментов семейства PARP были обнаружены эффекты ингибирования PARP на развитие опухолей и повышенная активность PARP в опухолевых клетках. Механизмы этих эффектов оставались неясными до тех пор, пока не выяснились функции еще одного фермента семейства PARP, открытого в 1998 г. Это была танкираза.

Впервые танкираза была обнаружена в Рокфеллеровском университете (Нью-Йорк) группой, изучающей белковые компоненты теломер. Этот ранее неизвестный фермент был локализован на теломерах человека, его белковым субстратом был один из теломерных белков, и первое время фермент считался связанным с теломерами регулятором теломеразы [12]. Однако уже через год была показана его локализация на ядерных порах [13], а еще через год – в аппарате Гольджи и в цитоплазматических везикулах [14]. Поэтому стало ясно, что функциями на теломерах роль танкиразы не ограничивается.

Подавление активности танкиразы в клетках человека приводит к аресту митоза и их последующей гибели [15, 16]. Показано, что танкираза необходима для расхождения гомологичных хромосом [17-19], но ее присутствие было также обнаружено в центросомах, где роль этого фермента до сих пор остается неясной.

Как оказалось впоследствии, участие танкиразы в регуляции пролиферации и поддержания целостности теломер свойственно далеко не всем живым существам.

Этот фермент обнаружен только в геноме животных и некоторых простейших, но отсутствует у растений, грибов и прокариот. Кроме того, эволюция танкиразы происходила практически целиком в пределах царства животных.

Как показано на рис.1, танкираза возникла у простейших, вероятно в результате слияния генов PARP-1 и анкирина. У простейших и примитивных беспозвоночных животных фермент еще сохраняет один из важных признаков PARP-1 – присутствие кроме каталитического также и прилегающего к нему регуляторного PARP домена (рис.2).

У танкираз насекомых и хордовых регуляторный PARP домен замещен SAM доменом, происхождение которого остается неизвестным. У позвоночных жи-

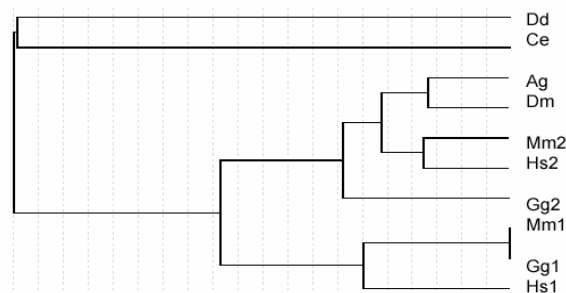


Рис.1. Филогенетическое древо танкираз:

Dd – *Dictyostelium discoideum*; Ce – *Caenorhabditis elegans*; Ag – *Anopheles gambiae*; Dm – *Drosophila melanogaster*; Mm2 – *Mus musculus* tankyrase 2; Hs2 – *Homo sapiens* tankyrase 2; Gg2 – *Gallus gallus* tankyrase 2; Mm1 – *Mus musculus* tankyrase 1; Gg1 – *Gallus gallus* tankyrase 1; Hs1 – *Homo sapiens* tankyrase 1.

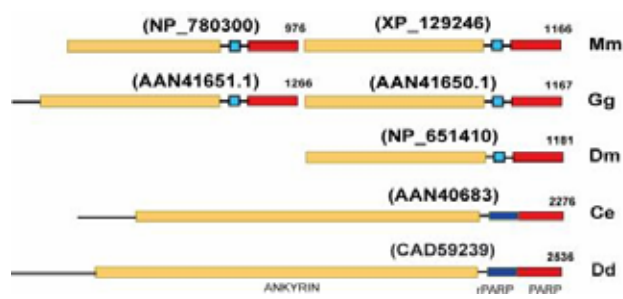


Рис.2. Схемы доменных структур танкираз мыши (Mm), цыпленка (Gg), дрозофилы (Dm), нематоды (Ce) и простейших (Dd). На схемах слева направо показаны домены анкириновый (ANKYRIN), регуляторный PARP (rPARP) и каталитический (PARP). У большинства животных регуляторный PARP домен замещен на SAM (квадрат). В скобках указаны коды доступа к последовательностям в базе данных Genbank, цифрами в конце каждой схемы указан размер белка в аминокислотных остатках.

вотных, кроме того, произошло удвоение гена, и вместо одной танкиразы, как у беспозвоночных и простейших, человек и другие хордовые имеют два изоформа танкиразы. Ген танкиразы-1 человека локализован на хромосоме 8, а танкиразы-2 – на хромосоме 10.

Работа с танкиразой-2 на момент публикации первой статьи о танкиразе-1 уже велась в нескольких лабораториях, и ее первые результаты были опубликованы в 2001 г. Изозим 2 был клонирован как опухолевый антиген [20, 21]. Не менее 10% больных раком молочной железы и толстого кишечника имеют в кро-

ви заметное количество антител против этого белка, в то время как у здоровых людей аутоиммунный ответ против танкиразы-2 встречается редко [22]. При иммуногистохимическом анализе большее или меньшее количество этого белка также может быть обнаружено в 20-30% опухолей молочной железы, в то время как в здоровых тканях и в большинстве раковых опухолей этот антиген не определяется. В норме танкиразу-2 можно видеть в эпителии почечных канальцев и тонкого кишечника [23].

Нокаут гена танкиразы-2 у мышей дал жизнеспособных животных, хотя их рост по сравнению с контрольной группой и был заметно замедлен [24, 25]. Оказалось, что у мышей танкираза не функционирует на теломерах [26] и при митозе, а замедление роста, по-видимому, связано с дисфункцией почек и кишечника.

Когда танкираза может быть обнаружена в клетках опухолей, она, так же как и в эпителии почечных канальцев, локализована в цитоплазме [23]. При ультрацентрифугировании фермент ассоциирован преимущественно с цитоплазматическими везикулами, хотя некоторая часть его находится в растворе [27]. Растворимая танкираза связана в прочный комплекс с другими белками [28, 29], которые также могут быть ассоциированы с цитоплазматическими везикулами, поэтому можно предположить, что основная функция танкиразы – регуляция везикулярного транспорта. Роль танкиразы в регуляции митоза и в поддержании целостности теломер в эволюции появилась на сравнительно поздних стадиях и, возможно, свойственна лишь человеку и некоторым животным.

Известно, что активность танкиразы регулируется инсулином и другими пептидными гормонами через сигнальный путь Ras-MAPK [14], включающий продукты нескольких онкогенов. По-видимому, с этим связано отсутствие заметного повышения экспрессии этого фермента в большинстве опухолей [23], хотя некоторое повышение ферментативной активности было отмечено во всех исследованных линиях опухолевых клеток [27]. Когда механизм злокачественной трансформации включает постоянную активацию онкобелков каскада Ras-MAPK, активность танкиразы возрастает за счет посттрансляционной модификации и без заметного увеличения количества фермента.

Всего геном человека содержит семнадцать генов семейства PARP [5], из которых о большинстве в литературе имеются лишь отрывочные сведения. Поэтому в ближайшем будущем следует ожидать дальнейшего роста исследований как самих этих ферментов, так и их эффекторов или лекарственных препаратов, разработанных на их основе. На сегодняшний день известно несколько методов определения активности ферментов семейства PARP, из которых для высокопроизводительного скрининга эффекторов наиболее перспективным, вероятно, является недавно запатентованный способ синтеза искусственного субстрата, дающего цветную реакцию [30].

Автор благодарит РФФИ за финансовую поддержку (грант 06-04-49388).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ame J. C., Spenlehauer C., de Murcia G. Bioessays 2004; 26: 882-893.
2. Beneke S., Bürkle A. Nucleic Acids Res. 2007; 35: 7456-7465.
3. De Soto J.A., Deng C.-X. Int J Med Sci. 2006; 3: 117-123.
4. Hassa P.O., Haenni S. S., Elser M., Hottiger M.O. Microbiol Mol Biol Rev. 2006; 70: 789-829.
5. Otto H., Reche P.A., Bazan F., Dittmar K., Haag F., Koch-Nolte F. BMC Genomics 2005; 6: 139.
6. Pachter P., Szabó C. Cardiovasc Drug Rev. 2007; 25: 235-260.
7. PARP as Therapeutic Target (Jie Zhang, eds.), CRC Press LLC, 2002.
8. Smith S. Trends Biochem Sci. 2001; 26: 174-179.
9. Szabó C., Dawson V.L. Trends Pharmacol Sci. 1998; 19: 287-298.
10. Alkhatib H. M., Chen D., Cherney B., Bhatia K., Notario V., Giri C., Stein G., Slattery E., Roeder R.G., Smulson M.E. Proc. Nat. Acad. Sci. 1987; 84: 1224-1228.
11. Kurosaki T., Ushiro H., Mitsuuchi Y., Suzuki S., Matsuda M., Matsuda Y., Katunuma N., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T., Inayama S., Shizuta Y. J. Biol. Chem. 1987; 262: 15990-15997.
12. Smith S., Giriat I., Schmitt A., de Lange T. Science 1998; 282: 1484-1487.
13. Smith S., de Lange T. J. Cell Sci. 1999; 112: 3649-3656.
14. Chi N.W., Lodish H.F. J Biol Chem. 2000; 275: 38437-38444.
15. Chang P., Coughlin M., Mitchison T.J. Nat Cell Biol. 2005; 7: 1133-1139.
16. Chang W., Dynek J.N., Smith S. Biochem J. 2005; 391: 177-184.
17. Canudas S., Houghtaling B.R., Kim J.Y., Dynek J.N., Chang W.G., Smith S. EMBO J. 2007; 26: 4867-4878.
18. Hsiao S.J., Smith S. Biochimie 2008; 90: 83-92.
19. Dynek J.N., Smith S. Science. 2004; 304: 97-100.
20. Kuimov A.N., Kuprash D.V., Petrov V.N., Vdovichenko K.K., Scanlan M.J., Jongeneel C.V., Lagarkova M.A., Nedospasov S.A. Genes Immun. 2001; 2: 52-55.
21. Monz D., Munnia A., Comtesse N., Fischer U., Steudel W.I., Feiden W., Glass B., Meese E.U. Clin Cancer Res. 2001; 7: 113-119.
22. Shebzukhov Y.V., Lavrik I.N., Karbach J., Khlgatian S.V., Koroleva E.P., Belousov P.V., Kashkin K.N., Knuth A., Jager E., Chi N.W., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Cancer Immunol Immunother. 2007; в печати.
23. Sidorova N., Zavalishina L., Kurchashova S., Korsakova N., Nazhimov V., Frank G., Kuimov A. Cell Tissue Res. 2006; 323: 137-145.

24. Chiang Y.J., Nguyen M.L., Gurunathan S., Kaminker P., Tessarollo L., Campisi J., Hodes R.J. Mol Cell Biol. 2006; 26: 2037–2043.
25. Hsiao S.J., Poitras M.F., Cook B.D., Liu Y., Smith S. Mol Cell Biol. 2006; 26: 2044–2054.
26. Muramatsu Y., Ohishi T., Sakamoto M., Tsuruo T., Seimiya H. Cancer Sci. 2007; 98: 850–857.
27. Куимов А.Н., Терехов С.М. Биохимия 2003; 68: 318–327.
28. De Rycker M., Price C.M. Mol Cell Biol. 2004; 24: 9802–9812.
29. Сидорова Н.Н., Фадеев А.О., Куимов А.Н. Биохимия 2008; 73: 356–363.
30. Nottbohm A.C., Dothager R.S., Putt K.S., Hoyt M.T., Hergenrother P.J. Angew Chem Int Ed Engl. 2007; 46: 2066–2069.

С.Н. Новиков

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МАТРИЦЫ ПИРАЗИН- СВЯЗЫВАЮЩИХ ТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, г. Санкт-Петербург

Современная тенденция развития фармацевтических нанотехнологий свидетельствует о больших перспективах использования в клинической практике новых лекарственных препаратов, ассоциированных с белковой матрицей-носителем (Платэ и др., 2001). Дальнейшие исследования в этом направлении, с одной стороны, могут привести к резкому удешевлению и значительному повышению эффективности действия лекарственных средств, с другой – к снижению нежелательных побочных эффектов (Новиков, 2004). Некоторые из алкилпроизводных пиразина ($C_4H_4N_2$) обладают выраженной физиологической активностью и являются высокоперспективными средствами в терапии ряда социально значимых заболеваний, в первую очередь, – онкологических (Касьяненко и др., 2002; Yamaguchi et al., 2003). Пиразин-связывающие белки (pyrazine-binding proteins, PygBP) относятся к семейству низкомолекулярных транспортных белков с М.м. 18–22 кДа – липокалинов, осуществляющих адресный перенос гидрофобных физиологически активных соединений к органу- (ткани-) мишени в жидких средах (кровь, лимфа, слеза). В докладе представлен подробный анализ современного состояния экспериментальных исследований по генотоксичности 2,5-диметилпиразина (2,5-DMP), дано теоретическое обоснование перспектив создания новой группы противоопухолевых препаратов на основе 2,3,5,6-тетраметилпиразина (ТМР, лигустразина), ассоциированного с рекомбинантным пиразин-связывающим белком. Рассмотрены принципы конструирования новых лекарственных соединений в составе полимерной матрицы PygBP (Новиков, 2005). Особое внимание уделено разработке неинвазивных (ингаляционных) методов введения данного комплекса и результатам экспериментальных работ по выделению в клетках обонятельной выстилки и легочной ткани млекопитающих специфических рецепторов к PygBP (Boudjelal et al., 1996).

Н.Ю. Анисимова¹, М.В. Киселевский¹, О.К. Жукова¹, А.В. Соснов², А.А. Гах²

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ БИОМИШЕНИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ГОРМОНОРЕЗИСТЕНТНОГО РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ДЕЙСТВУЮЩИЕ НА НИХ ТАРГЕТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

¹*Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

²*Исследовательский Институт Химического Разнообразия, Химки*

²*Oak Ridge National Laboratory, USA*

Рак предстательной железы (РПЖ) занимает 3–4 место в мировой структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями среди мужского населения. В США — 1-е место по заболеваемости

(около 300 тыс. больных в год), в Западной Европе — 1–2 места (около 200 тыс. больных в год). В России РПЖ за последние 10 лет занимает первое место по приросту заболеваемости и четвертое в ее структуре.

Основными факторами риска развития РПЖ являются: генетическая предрасположенность, возраст, расовая принадлежность, так называемая «западная» диета, отличающаяся дисбалансом в сторону увеличения процентного содержания белков мяса, молока, жира и кальция, увеличение частоты возникновения и длительности воспалительных процессов, малоподвижный образ жизни, что приводит, в частности, к увеличению концентрации тестостерона в крови.

Основой первичной терапии является хирургическое удаление пораженного органа и/или гормонотерапия. Применение антиандрогенных препаратов обусловлено их конкуренцией с метаболитом тестостерона дигидротестостероном за сайты связывания андрогенных рецепторов на поверхности клеток предстательной железы. Этот факт на начальных этапах терапии приводит к снижению чувствительности клеток к соответствующему лиганду за счет уменьшения репликации андрогенных рецепторов, снижению концентрации тестостерона и, в результате, к стабилизации опухолевого процесса. Однако данный терапевтический подход с течением времени, приводит к накоплению в опухоли гормон-резистентных клеток, что выражается в рецидивировании опухолевого процесса, часто осложненного появлением метастаз. Создание эффективных на этом этапе химиотерапевтических препаратов требует понимания механизмов развития гормонорезистентности и выявления фармакологически наиболее значимых для терапии мишеней.

На рис.1 приведена схема, показывающая 6 возможных путей развития резистентности раковых клеток к действию андрогенов.

1. Увеличение «чувствительности» андрогенных рецепторов. Даже небольшое количество тестостерона за счет усиления активности 5-редуктазы обеспечивает локальный высокий уровень дегидро-

тестостерона и приводит к увеличению продукции клеткой андрогеновых рецепторов.

2. Утрата андрогеновыми рецепторами специфичности. В результате мутации андрогеновые рецепторы раковых клеток утрачивают строгую специфичность и способны активироваться не только андрогенами, но и другими стероидами, факторами роста (EGF), цитокинами, концентрация которых в крови часто очень значительна.

3. Утрата способности опухолевых клеток к апоптозу. Это происходит из-за угнетения PTEN (гена опухолевой супрессии), что ведет к повышению активности фосфатидил-инозитол киназы 3, повышению Akt и усиленной экспрессии Bcl2 (антиапоптотического протеина). В результате - опухолевые клетки теряют способность к апоптозу.

4. Нейропептиды. Нейроэндокринные клетки могут синтезировать нейропептиды, такие как серотонин и бомбезин, способные активизировать деление «спящих» раковых клеток ткани предстательной железы.

5. Обусловлен корегуляторами. Дисбаланс между коактиваторами и корепрессорами, которые функционируют как система сигналов между андрогеновыми рецепторами и генами транскрипции, может приводить к гиперреакции в ответ на стимуляцию рецептора низкой концентрацией соответствующего лиганда.

6. Регенерация стволовых клеток. Стволовые клетки ткани предстательной железы, не имеющие на мембране рецепторов к андрогенам и факторам апоптоза и достаточно медленно делящиеся, могут дать начало популяции раковых клеток, нечувствительных к гормональной и радиационной терапии.

Таким образом, не подлежит сомнению тот факт, что в настоящее время терапия гормон-резистентного РПЖ представляет собой весьма актуальную проблему. Практикующими врачами намечены принципиальные подходы к терапии этого вида рака, что требует наличия широкого арсенала действенных лекарственных средств (Бикалутамид, антиандрогены, кортикостероиды, эстрогены, кетоконазол, кальцитриол и др.). Таргетная терапия данного метода нацелена в основном на прерывание лиганд-независимой фосфорилиции андрогенных рецепторов - как воздействуя на рецепторы факторов роста, так и напрямую, - прерывая сигнал к трансдукции. «Обходной» путь активации данной формы ракового процесса предполагается купировать, используя специфические ингибиторы Bcl2. Возможно также применение дестабилизаторов белка теплового шока 90 и веществ, ингибирующих активность остеокластов. Для предотвращения васкуляризации опухоли предложено использовать антитела к эндотелиальному фактору роста и вещества-антагонисты к эндотелиальному рецептору. Для стимуляции иммунной системы, усиливающей распознавание раковых клеток, предлагается использовать вакцины и ростовые факторы.

К настоящему времени сформулированы преимущественные направления воздействия современных

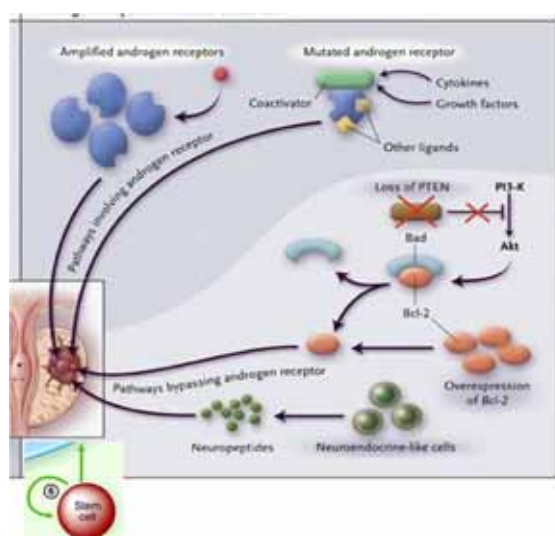


Рис.1. Возможные пути развития резистентности раковых клеток к действию андрогенов

терапевтических средств для лечения гормон-резистентного РПЖ. Наиболее значительно представлены вещества, обеспечивающие ингибцию митотической активности, ангиогенеза и сигналов трансдукции от андрогеновых рецепторов, а также индукторы апоптоза.

Для терапии РПЖ предлагается применение лекарственных веществ разделенных в соответствии с механизмом воздействия на следующие группы:

- ингибиторы и деграданты андрогеновых рецепторов, действующие на различные рецепторы, включая измененные;
- ингибиторы факторов роста;
- вещества, действующие на клеточный цикл деления;
- комбинированный подход.

Весьма перспективными представляются препараты – ингибиторы факторов роста. Целями их действия могут являться: PSMA (антиген, специфичный для мембраны клеток предстательной железы), GF (фактор роста), VEGF (рецептор фактора роста эндотелия сосудов), PDGFR (рецептор тромбоцитарного фактора роста), EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), ET-R (рецептор эндотелия), RTK (рецептор тирозин-киназы), HDAC (гистон-диацетилаза), Lu (лютеиниум) и mTOR (от *англ.* mammalian target of rapamycin).

Многими исследователями признается наиболее обоснованным комбинированный подход к терапии гормон-резистентного РПЖ – использование препарата – ингибитора фактора роста и химиотерапевтического средства. Например, в настоящее время проводится исследование эффективности схемы «доцетаксел + талидомид». Отмечено снижение уровня ПСА, удлинение времени до прогрессирования опухолевого роста и средней выживаемости больных.

Таким, образом, все вышеизложенное доказывает, что в настоящее время весьма актуальной является задача создания новых лекарственных препаратов для терапии гормон-резистентного РПЖ.

Поиску подходов для решения этой задачи посвящен проект, участниками которого являются сотрудники Исследовательского Института Химического Разнообразия, Российского Онкологического Научного Центра имени Н.Н. Блохина РАМН и Oak Ridge National Laboratory (США). Тема данного проекта сформулирована следующим образом: «Разработка новых ингибиторов протеиновых киназ в ряду гетероциклических соединений, включая фторсодержащие, в качестве противоопухолевых средств», а целью проекта является создание новых средств терапии рака предстательной железы. Основные этапы проекта включают отбор, синтез, скрининг и оптимизацию новых потенциальных лекарственных соединений. Текущей задачей проекта является создание новых веществ подавляющих рост гормонрезистентных клеток рака простаты. Ее решение планировалось в 2 этапа: скрининг наиболее перспективных химических веществ и их тестирование *in vitro*. В настоящее время

для дальнейшего исследования отобраны около 7000 веществ. Основной принцип отбора – потенциальное действие на фармакологически значимые мишени цикла деления гормонрезистентных клеток рака простаты (PC-3, DU-145). Эти вещества будут протестированы на чувствительность клеточных линий РПЖ и индуцирование килерной активности лимфоцитов.

На рис. 2 представлено распределение препаратов, индуцирующих цитотоксическую противоопухолевую активность натуральных киллеров, в зависимости от молекулярной мишени их воздействия.

Представленная схема демонстрирует, что наибольшее количество активных веществ является соединениями, нацеленными на ингибирование топоизомеразы I, полимеризацию тубулина и стабилизацию микротрубочек.

Представление о значимых молекулах-мишенях воздействия потенциальных лекарственных препаратов сформулировано как восстановление способности клеток к апоптозу после активации соответствующей целевой молекулы. Так, стимуляцию Akt, активирующего некоторые анти-апоптотические протеины, тормозит перифозин. Антиапоптотические протеины Bcl XL, Bcl2 угнетает облимарсен. NF-kB – угнетают бортезомиб и талидамид, а mTOR, стимулирующий клеточную пролиферацию, угнетается рапамицином, CCI-779. Было также установлено, что трихостатин А индуцирует в раковых клетках апоптоз, стимулируя экспрессию p53 и протеолиз p21, а также усиливает каспазную активность.

Для лечения рака предстательной железы наряду с химио- и радиотерапией, хирургическими методами лечения, оправданным является применение методов иммунотерапии. Особенно это актуально при лечении гормон-резистентного рака, когда гормоно- и радиотерапия неэффективны. Одним из основных иммунотерапевтических средств, можно считать введение больному аутологичной вакцины из дендритных клеток. Сначала осуществляют генерацию дендритных клеток *in vitro* из циркулирующих в периферической крови клеток-предшественников. Затем их нагружают антигеном и вводят пациенту внутривенно 3-хкратно, с интервалом в 2 недели.

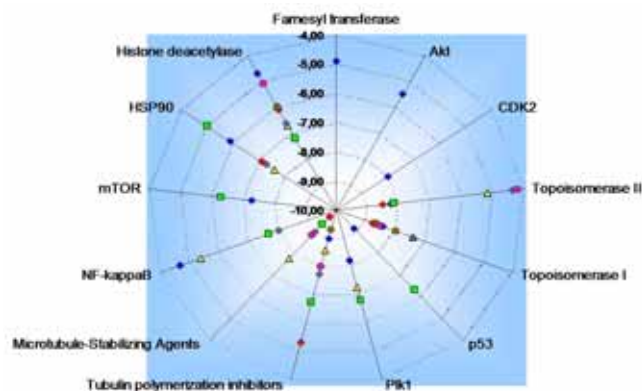


Рис.2. Лг (CC₅₀) активно исследуемых веществ, действующих на мишени гормонорезистентных клеток PC-3 и DU-145

В настоящее время уже намечены пути оптимизации методов таргетной терапии. Потенциал этого подхода очень велик. Так, предполагается, что нанороботы на основе дендримеров позволят распознавать раковые клетки, определять причины рака и локализацию опухоли, доставлять лекарства к биомитотическим и оценивать результат терапии (например подтверждать апоптоз раковых клеток). Созданные модели наночастиц позволяют подтвердить эти пред-

положения и свидетельствуют о повышении эффективности терапевтического воздействия в 5-10 раз. Разработаны формы терапевтических наночастиц (липосомы, фуллерены), включающие лекарственные средства без образования химических связей. Однако, хотя для терапии РПЖ ведутся разработки экспериментальных транспортных систем, к настоящему времени проблема доставки лекарств для лечения гормонорезистентного РПЖ не является решенной.

Е.В. Моисеева

ТЕСТИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ И/ИЛИ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ НА СИСТЕМЕ СПОНТАННЫХ МЫШИНЫХ МОДЕЛЕЙ РАКА МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ И ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Институт Биоорганической Химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва

Неоплазма переходит в фазу безудержного роста и метастазирования благодаря эффективному взаимодействию раковых клеток с элементами стромы, включающей разнообразие воспалительных реакций как явное проявление иммунного ответа организма хозяина на опухоль. Известно, что опухолеассоциированные лейкоциты могут как ингибировать, так и стимулировать опухолевый рост. Поэтому оригинальная четырех-ступенчатая система тестирования препаратов с предполагаемой противоопухолевой и/или иммуномодулирующей активностью была разработана с целью выявить как прямое, так и опосредованное действие исследуемых субстанций на рост опухоли, включая спонтанный рак молочных желез (РМЖ) и лимфолейкоз (ЛЛ) мышей линий BLRB/BYRB и CBRB. Нулевой цикл- тестирование противоопухолевых препаратов (ПП) *in vitro* на краткосрочных культурах РМЖ и ЛЛ, с одной стороны, и на культурах иммунных клеток как интактных мышей, так и опухоленосителей, с другой. Параллельно ПП тестируют на 1 этапе *in vivo*: на стартовых (летальных и полумлетальных), предстартовых **перевиваемых** терапевтических и хирургических сингенных моделях РМЖ и ЛЛ. При получении обнадеживающих результатов тестирование проводят на 2-м этапе - уже на **спонтанных** моделях РМЖ. В качестве заключительного этапа проводят тестирование ПП на **предопухолевых** моделях: самках мышей линий BLRB/BYRB с 90/95% частотой РМЖ и 10/5% частотой ЛЛ. Последний этап особенно рекомендуется для субстанций с предполагаемой иммуномодулирующей активностью.

Представленный доклад был посвящен описанию нашей оригинальной системы мышинных биомоделей семейного (семейного) РМЖ человека и новым способам тестирования и анализа действия ПП препаратов с использованием этой системы. Не вдаваясь в подробности, здесь будут представлены основные

положения представленных слайдов с краткими описаниями.

При обсуждении положительных и отрицательных сторон различных биомоделей сразу возникает ряд вопросов:

- Какие виды мышинных моделей РМЖ существуют? Какую лучше выбрать при проведении испытания данного ПП?
- Каковы критерии адекватности мышинной модели человеческому заболеванию?
- Почему каждая из имеющихся моделей по отдельности не удовлетворяет этим критериям?
- Для чего нужен комплекс мышинных моделей с различными характеристиками?

Виды мышинных моделей РМЖ, приведем их краткий перечень:

А - Традиционные:

- “Спонтанные” (MMTV - зависимые). Наиболее известный представитель – линия мышей C3H, которая при содержании в SPF (specific pathogen free) условиях, естественно, теряет экзогенный ретровирус и, заодно, и высокую частоту «спонтанного» (то есть, развивающегося естественным, не зависящим от экспериментатора) РМЖ.
- Индуцированные химическими мутагенами.
- Перевиваемые: 1) мышь → мышь; 2) человек → мышь (с использованием иммунологически некомпетентных линий мышей Nude и SCID), при этом по месту перевивки различают эктотопические и ортотопические модели.

Б – Современные: генетически измененные модели бывают трансгенные (чужеродный ген экспрессируется в геноме мыши) и нокаутные (интересующий исследователя ген «выбивается» из генома мыши, или инактивируется). При этом различают два класса моделей:

- Конвенционные (conventional), или обычные – первые модели, в которых ген экспрессируется или инактивируется во всех органах и тканях молодых самцов и самок [1-3].
- Кондиционные (conditional), или избирательные – более современные модели, в которых ген экспрессируется или инактивируется избирательно только в органе-мишени [4, 5].

Выводы:

- Ни один отдельно взятый тип мышинных моделей не может адекватно воспроизвести РМЖ человека, так как каждый вид биомоделей, включая и генетически измененные, имеет свои преимущества и недостатки.
- Следовательно, для моделирования широкого спектра параметров человеческого РМЖ необходимо проводить тестирование ПП на комплексе мышинных моделей.
- Примером такого комплекса является коллекция мышинных моделей, созданная и поддерживаемая нами в ИБХ РАН.

Оригинальность нашего подхода к тестированию ПП, разработанного в ходе многолетних испытаний самых разных терапевтических агентов можно наглядно представить в виде «трех С» [6]:

1С - Система мышинных моделей, воспроизводящих весь спектр изменения железистого эпителия от гиперплазий и доброкачественной опухоли (лактлирующая аденома), до карциномы *in situ* и инвазивного РМЖ. Путем проведения сравнительного индивидуального анализа мышинного и человеческого РМЖ будет продемонстрировано: 1) индивидуальное разнообразие типов мышинного РМЖ; 2) определенное морфологическое сходство с аналогичными человеческими РМЖ; и 3) самое удивительное, - сходное прогностическое значение гистопатологических особенностей удаленной в ходе мастэктомии опухоли (на примере типов «comedo» с внутрипротоковым некрозом и крайне тяжелым прогнозом и медуллярного РМЖ, который при явной агрессивности, характеризуется выраженной лимфоидной инфильтрацией и относительно благоприятным прогнозом, как у человека, так и у мыши).

2С - Ступени последовательного тестирования противоопухолевого действия анализируемой субстанции от нулевого цикла (параллельное тестирование *in vitro* на краткосрочных культурах опухолевых и иммунных клеток) и первой ступени – на перевиваемых моделях РМЖ и ЛЛ, до проведения испытаний на спонтанном РМЖ (III ступень) и предопухолевых самках высококорактовых линий (заключительная, IV ступень для апробации препарата в режиме профилактики).

3С - Селекция, или выявление «успешных» и «неуспешных» подгрупп реципиентов внутри леченных ПП групп [7]. Анализ действия ПП проводится не только по средним показателям (рост опухоли и выживание) леченной и контрольной групп, но и по индивидуальным параметрам реципиентов в подгруппах

по сравнению с характеристиками соответствующей контрольной подгруппы. С целью выявить внутри каждого эксперимента «успешных» и «неуспешных» реципиентов выделяют подгруппы, как в опытной, так и в контрольной группах по одинаковому критерию, выбранному в соответствии с индивидуальными характеристиками опухолей на момент начала лечения. Как известно, даже широко применяемые в онкологической практике ПП (например, таксол), при тестировании на наших моделях этим методом вызывают замедление роста РМЖ только у 50-70% реципиентов в зависимости от дозы и времени начала лечения. Более того, при отмене цитотоксического препарата часто наблюдается вторичная стимуляция роста и ранняя гибель реципиентов по сравнению с нелеченным контролем. Это заставляет искать новые пути лечения (иммунотерапия и нацеленная терапия).

Далее позвольте остановиться на каждом из трех пунктов по отдельности.

1С–система мышинных моделей

Система в настоящее время состоит из племенных ядер мышей 5 инбредных линий. Центральное место в коллекции принадлежит трем высококорактовым мышам трех разных генотипов, к тому же гомозиготных по одинаковому хромосомному маркеру Rb(8.17)11em (2 метацентрические среди нормальных акроцентрических мышинных хромосом на метафазной пластинке). Спонтанная частота РМЖ падает от 99% у многорожавших самок BYRB до 75% у самок CBRB (сингенных мышам линии CBA). Две линии, а именно A/WySn и BALB/c поддерживаются в качестве низкоопухолевых контролей, что показано на схеме:

99%	→	90%	→	75%	→	5%	→	1%
BYRB		BLRB		CBRB		A/WySn		BALB/c

Изредка появляющиеся РМЖ самок A/WySn и BALB/c позволяют исследователям получать и поддерживать интересные перевиваемые модели с характеристиками, отсутствующими у спонтанных мышинных РМЖ. Примером является установленная опухолевая линия VMR-L мышей A/WySn, которая при поддержании *in vivo* метастазирует в лимфатические узлы (ЛТУ), рисунок 1 [8].

Приведенная таблица 1 показывает, что только используемый нами комплекс мышинных моделей в совокупности воспроизводит практически все характеристики человеческого РМЖ, за исключением метастазирования в костный мозг, характерного для человека и еще не найденного у мышей нашей коллекции.

Проведенный гистопатологический анализ позволил выявить поразительное сходство большинства типов РМЖ мышей нашей коллекции (как протокового, так и долькового) аналогичным типам человеческого рака. Это тем более интересно, потому что в мировой литературе считается, что мышинные MMTV - зависимые опухоли молочных желез (ОМЖ) при поддержании мышей в нормальных условиях вивария характеризовались монотонной структурой и воспро-

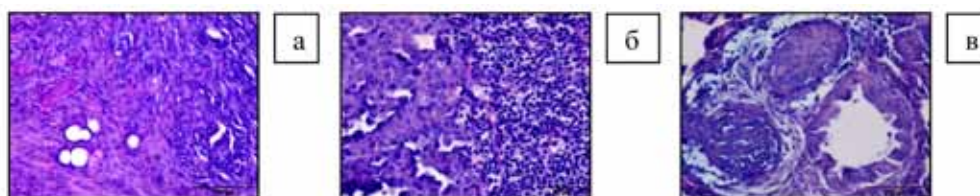


Рис. 1.

изводили только неинвазивный дольковый рак человека [1, 9]. А при поддержании в SPF (specific pathogen free) условиях MMTV - зависимые высоко-раковые линии и вовсе потеряли высокий процент РМЖ (вследствие потери ретровируса).

Несоответствие наших данных (индивидуально разнообразные раки 10 типов с индивидуально разной инвазивностью и прогнозом) можно объяснить тем, что, с одной стороны, образования, наиболее схожие с человеческими, можно наблюдать, как правило, в мышинных опухолях микроскопических размеров. Тогда как большинство макроскопических образований уже представляют собой сложно интерпретируемую совокупность нескольких типов РМЖ и, более того, как правило, включают нормальные и гипертрофированные ткани молочной железы, явно случайно попавшие в состав разрастающейся опухоли, что еще более осложняет интерпретацию. С другой стороны, уникальные морфологические особенности ОМЖ мышей RB - линий могут объясняться не только осо-

бенностями генотипа самих мышей, но и новыми генетическими характеристиками сублинии РНК-содержащего ретровируса MMTV, вызывающего опухоли мышей путем мультистадийного инсерционного мутагенеза. Механизмы каждого этапа у мышей СЗН описаны [10-14]. Родство мышей наших RB - линий с этой известной линией позволило предположить наличие у них сходного механизма. Действительно, экзогенные вирусные последовательности ДНК (образованной в лимфоидных клетках из РНК ретровируса с помощью фермента обратной транскриптазы) были обнаружены в лимфоидных клетках наших трех линий [6]. Известно, что именно зараженные Т и В лимфоциты доставляют вирусные последовательности в делящиеся клетки эпителия МЖ (в случае эпителиальной тропности, и в клетки иммунной системы, - в случае лимфоидной тропности вируса) [15]. Далее, в ходе взаимодействия ДНК экзогенного ретровируса и ДНК эндогенного провируса в составе генетического окружения данной линии и рождается новая последо-

Таблица 1

Параметры РМЖ наших мышинных моделей по сравнению с человеческими

Параметры РМЖ		Человек	Мышинные модели рака молочной железы			
			A/WySn, перевиваемый		Rb линии, спонтанный	BALB/c, перевиваемый
			VMR-L	VMR-0		
Морфология рака молочной железы	Протоковый	++	-	-	+	-
	Дольковый	+	-	-	++	+
	Аденома	+	-	-	+	-
	In situ	+	-	-	+	-
	Медулярный	+	+	-	+	-
	Веретено-клеточный	+	-	+	-	-
Скорость роста	Медленная	++	+	-	+	+
	Быстрая	+	-	+	++	+
Метастазирование через:	Кровь	+	+	+	+	-
	Лимфу	+	+	-	+	-
Основные органы метастазирования	Лимфоузлы	+	+	-	+	+
	Легкие	+	+	+	+	+
	Печень	+	+	-	-	+
	Селезенка	+	+	-	-	+
	Почки	+	+	-	-	-
	Костный мозг	+	-?	-?	-?	-

вательность ДНК, обладающая способностью случайно внедряться в неслучайные участки генома, приводя к экспрессии находящихся там генов, которые не являются онкогенами [16]. Однако, каскад взаимодействия продуктов этих генов и приводит, в конечном итоге, к образованию первого и последующих клонов опухоли молочной железы [17, 18]. Таким образом, совершенно разные типы ОМЖ могут появиться даже у однопометных самок и в разном возрасте; более того, не только опухоли разных локализаций одной и той же самки (рисунок 2) могут быть морфологически различными, но даже внутри одной и той же опухоли несколько типов РМЖ.

Такая индивидуальная вариабельность ОМЖ мышей RB линий полностью воспроизводит исключи-

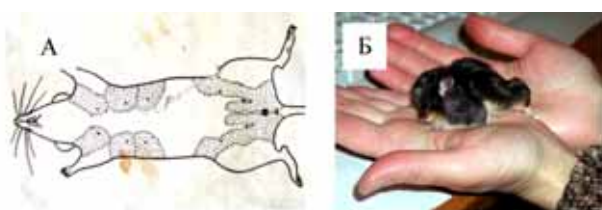


Рис. 2. Все тело мыши предлагается считать моделью молочной железы человека:

А - распределение ткани молочных желез по телу самки, иллюстрация из *Biology of laboratory mouse*, 1949;

Б - на моих ладонях самка BYRB с пятью спонтанными ОМЖ различных локализаций.

тельную вариабельность РМЖ человека. Описанный выше механизм объясняет, каким образом в инбредной линии мышей, являющейся по существу популяцией однойцевых близнецов, возникают разнообразные типы РМЖ мыши, воспроизводящие практически все основные типы РМЖ человека.

Ассоциации РМЖ с другими раками (в первую очередь, рака яичника и матки) и лейкозами встречаются в семьях с наличием двух или более родственников, уже заболевших РМЖ (Рисунок 3). Как известно, лейкозы встречаются чаще именно в популяции пациентов с РМЖ [19, 20].

Интересно, что никаких известных наследственных (передающихся через половые клетки) мутаций, предрасполагающих к РМЖ, то есть онкогенов, в таких семьях пока не обнаружено. Это и позволяет дистанцировать семейный РМЖ от наследственного, где доказано наследование известных онкогенов (например, BRCA1 и BRCA2) от матери к дочерям. В семьях со случаями множественных раков внутри семейного РМЖ мы предполагаем наличие механизмов, подобных инсерционному мутагенезу у мышей [21, 22], который может объяснять появление в таких семьях различных раков и лейкозов при отсутствии унаследованных онкогенов. Однако ретровирусная гипотеза возникновения РМЖ у человека еще не доказана [23-25]. Аргументом в пользу существования у человека подобных механизмов является доказательство ретровирусной природы Т-лимфолейкозов (Т-ЛЛ) у человека [26, 27].

Рисунок 4 демонстрирует, что помимо РМЖ у RB мышей с определенной частотой встречаются Т-лимфолейкозы, рак яичника, рак матки. Таким обра-

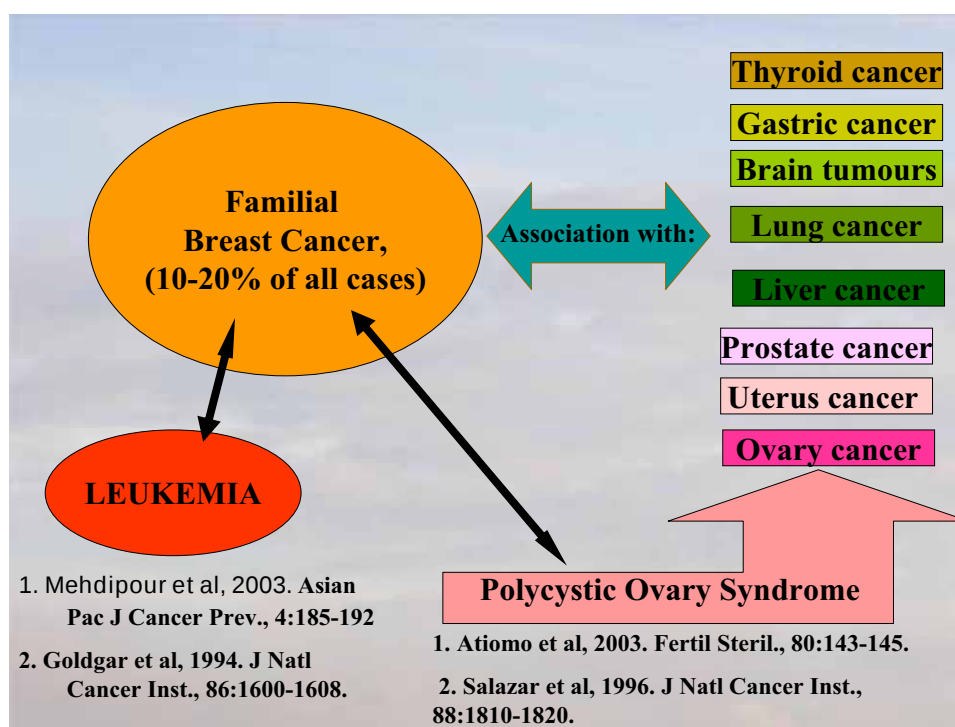


Рис. 3. Случаи множественных раков встречаются в семьях с семейным РМЖ

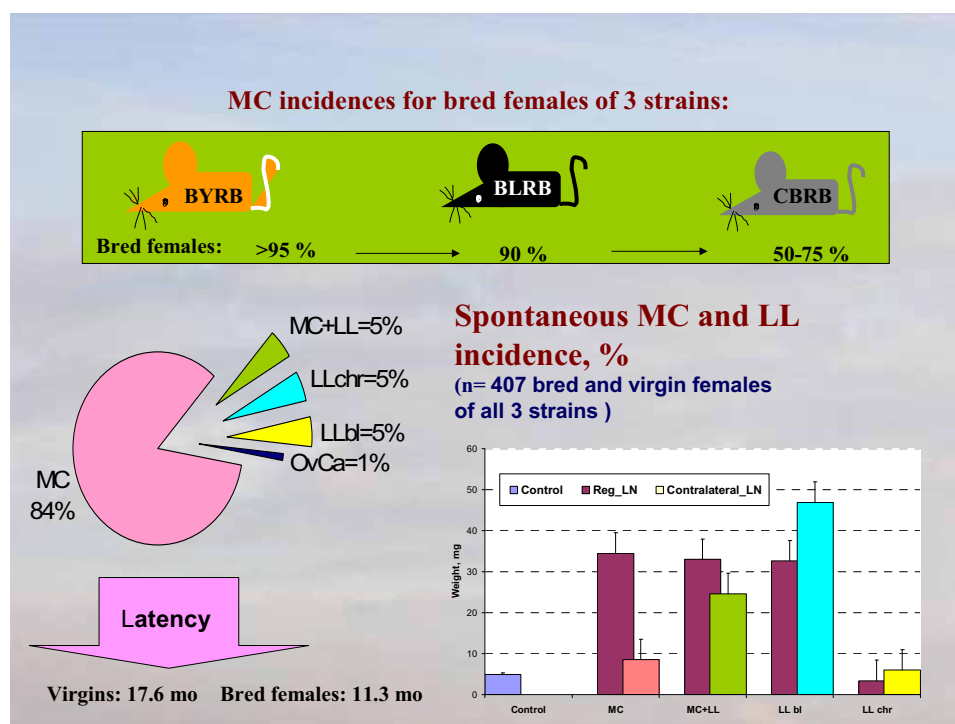


Рис. 4. Частота РМЖ (MC), рака яичника (OvCa) и лимфолейкоза (LL), при этом встречаются как хроническая (LLchr), так и бластная формы (LLbl), в соответствии с аналогичными лимфолейкозами человека. Справа внизу показан вес лимфатических узлов (регионарных и контралатеральных) для мышей со спонтанными РМЖ и лимфолейкозом.

зом, мыши RB линий в определенном смысле воспроизводят случаи множественных раков внутри семейного РМЖ. Все приведенные данные в совокупности позволяет считать RB - линии мышей моделью семейного РМЖ человека.

Наличие спонтанных РМЖ и ЛЛ позволяет постоянно получать опухолевые клетки из спонтанных опухолей для перевивки сингенным реципиентам с целью последующего испытания ПП [28-32].

2С - ступени тестирования

Все ПП в идеальном случае должны пройти 4-ступенчатую процедуру тестирования (рис. 5). Предложенная оригинальная схема позволяет выявить действие препарата:

Как прямое, так и опосредованное иммунной системой, на рост опухоли *in vitro* и *in vivo*;

Как на организм опухоленосителя с перевитыми (мыши с запущенными перевитыми опухолями, *advanced models*), так и со спонтанными ОМЖ;

Как на организм интактных животных с нормальным иммунным статусом (предстартовые перевиваемые модели), так и предраковых самок пожилого возраста (IV ступень).

Следует отметить, что апробация препаратов проводится на этапах I и II как без, так и с проведением эстрипации перевитой (I этап) или спонтанной ОМЖ (II этап). В последнем случае испытания ПП проводят как до, так и

после хирургического удаления опухоли, подобно применению адьювантной терапии в клинике. Анализ фенотипа (методом цитофлуориметрии) и морфологии (методом гистопатологии) лейкоцитарных опухолевых инфильтратов (ЛИО) позволяет изучить состав и локализацию ЛИО в опухоли. Эти параметры являются прогностическими факторами как в клинике РМЖ, так и при проведении хирургического вмешательства в эксперименте.

3С – селекция «успешных» подгрупп

Традиционная методика анализа действия ПП в экспериментальной группе по средним различиям в росте ОМЖ и продолжительности жизни по сравнению с нелеченной контрольной группой не устраивает исследователя, желающего адекватно переносить результаты тестирования ПП с мыши на человека. Такой исследователь должен работать на уровне измерения параметров у индивидуальных животных с использованием пожизненных меток. Использование этой оригинальной методики позволяет [7]:

проследить динамику изменения опухолевых параметров у каждой мыши в отдельности;

обнаружить критерий (одинаковый для опытной и контрольной групп), предоставляющий возможность в данном эксперименте разделить реципиентов на подгруппы (например, в соответствии с размером опухоли на момент начала терапии) как в опытной, так и контрольной группах;

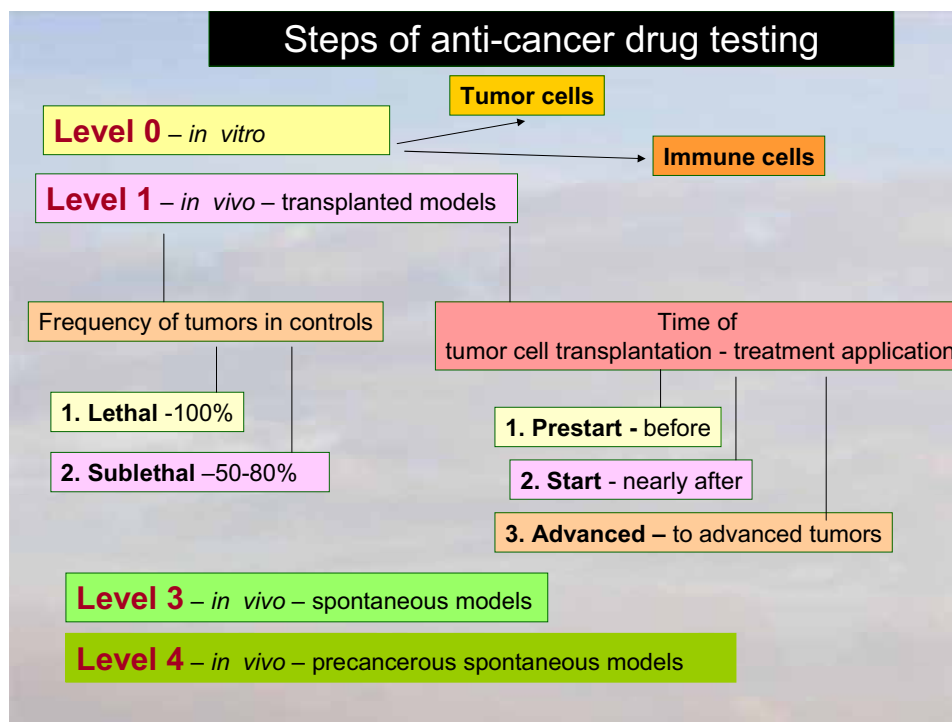


Рис. 5. Последовательные этапы тестирования ПП

выявить «успешные» и «неуспешные» подгруппы внутри экспериментальной группы в соответствии с замедлением или ускорением роста опухоли в соответствующей контрольной погруппе.

3С, на примере иммунотерапии ИЛ-2

Как работает, и что дает разработанная методика для анализа полученных результатов [7], проиллюстрировано на примере с тестированием противоопухолевых свойств интерлейкина 2 (ИЛ-2) на запущенной модели перевиваемого РМЖ мышей BALB/c при его применении внутрь опухоли до проведения хирургии (экстирпации опухоли). Левая часть рисунка 6 демонстрирует средние показатели роста ОМЖ по группам и показывает, что при наличии тенденции к замедлению роста опухоли, достоверного ингибирования роста спустя 3 и 5 дней после применения ИЛ-2 не было обнаружено. Полученные данные приводят к выводу о том, что известный иммуномодулятор не повлиял достоверно на рост ОМЖ, то есть не сработал в данной схеме применения препарата.

В соответствии с задачами данного эксперимента, все реципиенты были впоследствии прооперированы для определения, как иммунотерапия интерлейкином 2 до экстирпации опухоли повлияла на выживание мышей во время проведения операции, на появление вторичных ОМЖ, метастазирование и, в итоге, на суммарное выживание реципиентов.

Оказалось, что значительно большая часть мышей, леченных ИЛ-2, при меньшем размере опухолей погибла в ходе операции по сравнению с

меньшим процентом смертности у контрольных мышей, несущих ОМЖ большего размера. Такого рода негативные данные заставляют разрабатывать критерии для выявления «неуспешных» подгрупп. И действительно, разделив всех реципиентов в опытной и контрольной группах по начальному диаметру ОМЖ более или менее 4 мм, нам удалось показать, что у 70% леченных реципиентов с более медленно проявляющимися перевитыми опухолями ИЛ-2 вызвал достоверное замедление опухоли. У оставшихся мышей с более быстро проявляющимися ОМЖ ИЛ-2 вызвал тенденцию к стимуляции опухолевого роста, 80% мышей именно этой подгруппы погибло в результате осложнений в ходе экстирпации опухоли (вследствие ее инвазивности). Проведенный анализ по разработанной нами схеме позволил избежать ложно положительного вывода о тенденции ИЛ-2 к ингибированию роста ОМЖ в данной модели и позволил выявить, как достоверное замедление роста опухолей у 70% реципиентов с опухолями менее 4 мм на момент применения ИЛ-2, так и тенденцию к ускорению роста опухолей у оставшихся 30% реципиентов с опухолями более 4 мм на момент применения иммуномодулятора. Следует подчеркнуть, что проведение анализа действия ИЛ-2 нашим методом предостерегает от бездумного применения иммуномодуляторов в клинике всем пациентам без исключения и заставляет разрабатывать методики подбора пациентов, которым иммунотерапия действительно показана.

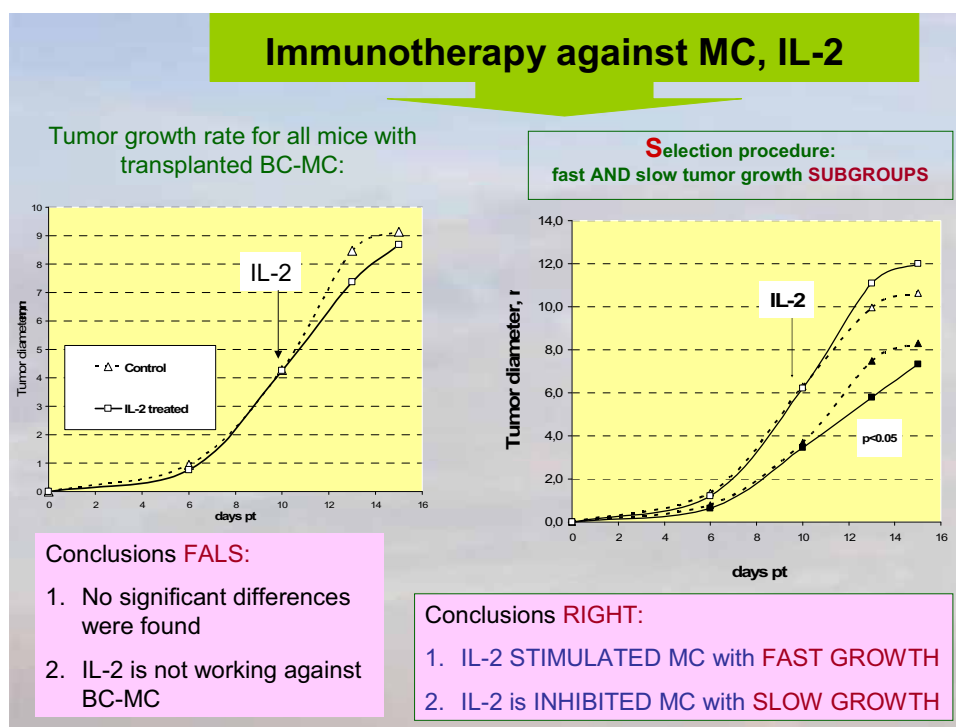


Рис. 6. Оригинальная методика выявления подгрупп со стимуляцией и замедлением роста ОМЖ внутри группы мышей-опухоленосителей, леченных однократно инъекцией интерлейкина 2 (IL-2, 1×10^6 ME) внутрь опухоли на 10-й день после перевивки опухолевых клеток

3С, на примере химиотерапии таксолом

Другой пример – испытание противоопухолевых свойств таксола (пять в.б. инъекции в дозах 5 и 15 мг на инъекцию) на п.к. перевиваемой запущенной модели РМЖ мышей CBRB; 8 реципиентов самцов было в каждой группе. Начали терапию на 30 день после перевивки опухоли при среднем размере опухоли 8.3 ± 0.6 мм. Никаких достоверных различий по росту опухоли при оценке по средним показателям для всех реципиентов в леченных группах по сравнению с контролем не было обнаружено.

Тогда в каждой группе были выделены подгруппы для мышей с размером опухоли меньше 10 мм на начало терапии (sgr1, рисунок 7), и анализ был проведен только для реципиентов этой подгруппы. Относительный прирост диаметра опухоли был достоверно уменьшен только во время применения препарата. После отмены препарата приросты опухолей в леченных группах превысили значения в контроле, что привело к более ранней гибели реципиентов, обработанных таксолом в дозе 15 мг на инъекцию, по сравнению с контролем; все погибшие животные демонстрировали признаки токсичности препарата. Реципиенты, обработанные таксолом в дозе 5 мг на инъекцию, жили дольше, чем контрольные.

Полученные данные позволяют сделать важные выводы:

1. При тестировании противоопухолевых свойств таксола замедление роста опухоли

было выявлено только в подгруппах с более медленным ростом перевитой опухоли до начала терапии;

2. Рост опухоли был достоверно замедлен только в течение времени проведения терапии.
3. Улучшение выживания наблюдалось только при лечении таксолом в дозе 5 мг на инъекцию.

Таким образом, ограниченное количество из всех пролеченных таксолом реципиентов (в дозе 5 мг на инъекцию) составили «успешную» подгруппу, а именно, $5/8=63\%$ в данном эксперименте. Неутешительные результаты заставляют искать методы более адекватной доставки цитотоксического агента к органам-мишеням, что возможно при нацеленной терапии [28, 30, 33].

В заключение, испытания как иммуномодулирующих, так и химиотерапевтических агентов на запущенных, или «терапевтических» мышинных моделях (рост перевитых ОМЖ в течение долгого времени до начала терапии) демонстрируют, насколько индивидуально разнообразен ответ организма реципиента на терапевтический агент, что определенно напоминает результаты применения подобных препаратов в клинике РМЖ человека. Построение индивидуальных прогнозов для мышей реципиентов в экспериментальной практике должно предшествовать применению препарата в клинике [34]. Таким образом, применение

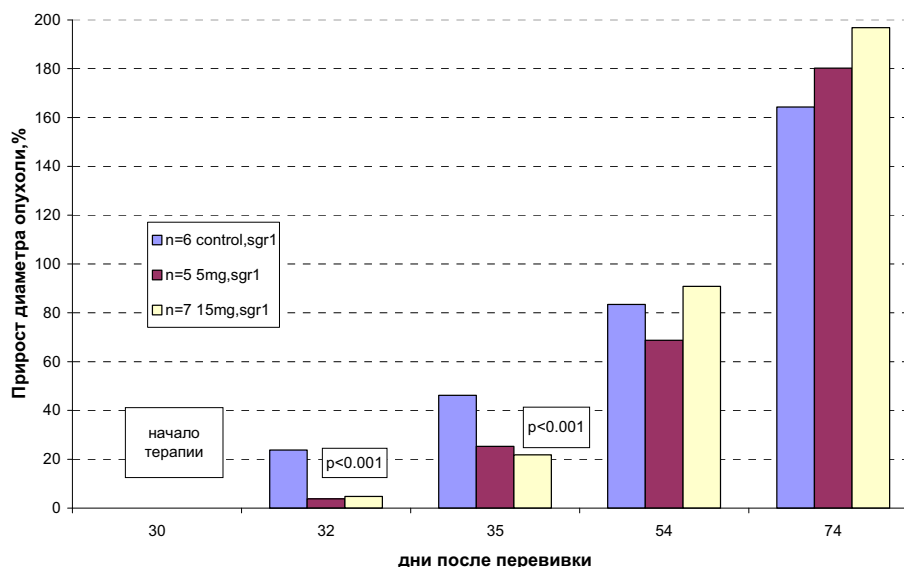


Рис. 7. Испытание противоопухолевых свойств таксола на терапевтической модели РМЖ мышей CBRB: рост опухоли достоверно замедлен только в течение проведения терапии

адекватных мышиных моделей и способов анализа действия препаратов во время проведения доклинических испытаний приближает нас к ответу на основной вопрос: «Каким образом предсказать индивидуальный ответ организма пациента на терапевтический агент до его применения?»

ЛИТЕРАТУРА

- Cardiff RD, Aguilar-Cordova E: Proto-neoplasia revisited: the molecular biology of mouse mammary hyperplasia. *Anticancer Res* 8: 925-934, 1988
- Cardiff RD, Anver MR, Gusterson BA, Hennighausen L, Jensen RA, Merino MJ, Rehm S, Russo J, Tavassoli FA, Wakefield LM, Ward JM, Green JE: The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting. *Oncogene* 19: 968-988, 2000
- Cardiff RD, Rosner A, Hogarth MA, Galvez JJ, Borowsky AD, Gregg JP: Validation: the new challenge for pathology. *Toxicol Pathol* 32: 31-39, 2004
- Xu X, Wagner KU, Larson D, Weaver Z, Li C, Ried T, Hennighausen L, Wynshaw-Boris A, Deng CX: Conditional mutation of *Brcal* in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. *Nat Genet* 22: 37-43, 1999
- Hursting SD, Nunez NP, Patel AC, Perkins SN, Lubet RA, Barrett JC: The utility of genetically altered mouse models for nutrition and cancer chemoprevention research. *Mutat Res* 576: 80-92, 2005
- Moiseeva E: Original approaches to test anti-breast cancer drugs in a novel set of mouse models. Pathobiology, Utrecht University, The Netherlands 191 pp, <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2005-1130-200033/index.htm>, 2005

- Moiseeva EV, Merkulova IB, Bijleveld C, Koten JW, Miroshnikov AI, Den Otter W: Therapeutic effect of a single peritumoural dose of IL-2 on transplanted murine breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 8: 487-496, 2003
- Moiseeva EV, Rapoport EM, Bovin NV, Miroshnikov AI, Chaadaeva AV, Krasilshchikova MS, Bojenko VK, Bijleveld C, van Dijk JE, Den Otter W: Galectins as markers of aggressiveness of mouse mammary carcinoma: towards a lectin target therapy of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 91: 227-241, 2005
- Hennighausen L: Mouse models for breast cancer. *Breast Cancer Res* 2: 2-7, 2000
- Czarneski J, Rassa JC, Ross SR: Mouse mammary tumor virus and the immune system. *Immunol Res* 27: 469-480, 2003
- Vaage J, Smith G, Asch B, Teramoto Y: Mammary tumorigenesis and tumor morphology in four C3H sublines with or without exogenous mammary tumor virus. *Cancer Res* 45: 945-977, 1986
- Komarova EA, Komarov PG, Kriukova IN: Detection of MMTV gp52 in C3H and C3Hf strain mice. *Vopr Virusol (Russian)* 4: 461-464, 1980
- Tekmal RR, N. K: Role of MMTV integration locus cellular genes in breast cancer. *Front Biosci.* 1997 Nov 1;2:d519-26. 1997
- Callahan R, Smith GH: MMTV-induced mammary tumorigenesis: gene discovery, progression to malignancy and cellular pathways. *Oncogene* 19: 992-1001, 2000
- Pobezinskaya Y, Chervonsky AV, Golovkina TV: Initial stages of mammary tumor virus infection are superantigen independent. *J Immunol* 172: 5582-5587, 2004

16. Callahan R: Somatic mutations that contribute to breast cancer. *Biochem Soc Symp* 63: 211-221, 1998
17. Katoh M: WNT and FGF gene clusters (review). *Int J Oncol* 21: 1269-1273, 2002
18. Callahan R, Egan SE: Notch signaling in mammary development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9: 145-163, 2004
19. Wiernik P, Hu X, Ratech H, Fineberg S, Marino P, Schleider MA, Etkind P, Walewski JA: Non-Hodgkin's lymphoma in women with breast cancer. *Cancer J* 6: 336-342, 2000
20. Tanaka H, Tsukuma H, Koyama H, Kinoshita Y, Kinoshita N, Oshima A: Second primary cancers following breast cancer in the Japanese female population. *Jpn J Cancer Res* 92: 1-8, 2001
21. Lubchenko LN, Pospechova NI, Bryuzgin VV, Lushnikova AA: Clinical and molecular characteristics of hereditary breast or/and ovarian cancer in Russian population. *Human Genet* 16: 148-149, 2004
22. Moiseeva E, Chaadaeva A, Bojenko V, Mehdi-pour P, Den Otter W: Mouse naturally arising mammary cancer: promising link to familial set of breast cancer [abstract]. *International Congress on Cancer Genetics*, Tehran, 13-16 December 2003; 102, 2003
23. Kriukova IN, Lushnikova AA, Malivanova TF: The possibility of the retroviruses participation in human breast neoplasm induction. *Vopr Virusol (Russian)* 47: 4-9, 2002
24. Labat ML: Possible retroviral etiology of human breast cancer. *Biomed Pharmacother* 52: 6-12, 1998
25. Goedert JJ, Rabkin CS, Ross SR: Prevalence of serologic reactivity against four strains of mouse mammary tumour virus among US women with breast cancer. *Br J Cancer* 94: 548-551, 2006
26. Cotterchio M, Nadalin V, Sauer M: Human breast cancer and lymphomas may share a common aetiology involving Mouse Mammary Tumour Virus (MMTV). *Med Hypotheses* 59: 492-494, 2002
27. Ahmed N, Heslop HE: Viral lymphomagenesis. *Curr Opin Hematol* 13: 254-259, 2006
28. Moiseeva EV, Vodovozova EL, Mikchalyov II, Molotkovsky JG: Testing of liposomal formulations of DL-melphalan and rubomycin lipid derivatives on new breast cancer mouse model. *Mouse Genome* 95: 895-897, 1997
29. Moiseeva EV, Kirilina EA, Mihailova AA: Immunotherapy of mouse mammary adenocarcinoma with myelopeptide-2. 10th international congress of immunology [Abstract] S1: 346, 1998
30. Moiseeva E, Vodovozova E, Chaadaeva A, Tuzikov A, Bovin N, Den Otter W, Molotkovsky Ju: Liposomal formulations of merphalan lipophilic prodrug equipped with SiaLeX-determinant cause prolong therapeutic effect on spontaneous mammary cancer. 2nd EU-FEPS/APGI Conference on optimising drug delivery and formulation "Evaluation of Drug Delivery Systems - Issues and Perspectives" 2005
31. Blishchenko EY, Sazonova OV, Kalinina OA, Moiseeva EV, Vass AA, Karelin AA, Ivanov VT: Antitumor effect of valorphin in vitro and in vivo: combined action with cytostatic drugs. *Cancer Biol Ther* 4: 118-124, 2005
32. Mushenkova N, Moiseeva E, Chaadaeva A, Svirshchevskaya E: Antitumor effect of double immunization of mice with mucin1 and its coding DNA. *Anticancer Res* 25:3893-3898, 2005
33. Vodovozova EL, Moiseeva EV, Grechko GK, Gayenko GP, Nifant'ev NE, Bovin NV, Molotkovsky JG: Antitumor activity of cytotoxic liposomes, equipped with selectin ligand SiaLeX, in mouse mammary adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 36: 942-949, 2000
34. Moiseeva EV, Bojenko VK, Fomina GG, Krasnovskaya OR, Krasilshchikova MS, Den Otter W: Can we predict individual mammary tumor growth rate in recipient mice? *Baltic J Lab Anim Sci* 12: 74-83, 2002

ПОИСК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ГЕНЕРАЦИИ ЗНАНИЙ

В.В. Поройков, А.А. Лагунин, О.Н. Коборова, А.В. Захаров, Д.А. Филимонов

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ МНОЖЕСТВЕННОГО ДЕЙСТВИЯ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва

Основная парадигма создания новых лекарств в XX веке базировалась на представлении об избирательном действии препарата на определенную молекулярную мишень, которое должно приводить к нормализации патологического процесса, а шестыми по сравнению с препаратами, действующими на одну единственную мишень. Поиск таких лекарств может базироваться на прогнозе спектра биологической активности с использованием компьютерной системы PASS, предсказывающей более 3000 видов биологической активности и молекулярных механизмов взаимодействия с другими мишенями в организме обычно связывают с проявлением нежелательных побочных эффектов и токсичности. С развитием постгеномных исследований стало ясно, что многие заболевания имеют сложную этиологию, и возникла концепция лекарств множественного действия, которые обладают преимуществами действия со средней точностью около 95%. В докладе обсуждаются возможности определения перспективных наборов молекулярных мишеней методами биоинформатики и выявления прототипов лекарств множественного действия в базах данных доступных образцов химических соединений. Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ №№ 05-03-08077, 05-07-90123, INTAS # 03-55-5218, ISTC # 3197, FP6 LSHB-CT-2007-037590.

Г.Н. Апрышко

БАЗА ДАННЫХ ПО ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ВЕЩЕСТВАМ НИИ ЭДИТО ОНКОЛОГИЧЕСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА ИМ. Н.Н. БЛОХИНА РАМН

ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Представлено описание Базы данных, содержащей информацию по химическому строению, свойствам и результатам изучения биологической активности около 12000 веществ, изучавшихся в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН и ряде других отечественных учреждений в 1952-2007 гг., приведены примеры ее использования для аналитических исследований по экспериментальной химиотерапии опухолей.

Начатые в нашей стране в 1945 году при создании в Институте онкологии АМН СССР в Ленинграде первой лаборатории экспериментальной терапии рака научные исследования по поиску противоопухолевых лекарств были продолжены в организованном в 1951 году в Москве Институте экспериментальной патологии и терапии рака АМН СССР (в настоящее время

Российский Онкологический Научный Центр (РОНЦ) им. Н.Н. Блохина РАМН). В лаборатории экспериментальной химиотерапии РОНЦ в 1952 года в содружестве с химиками различных учреждений страны был начат широкий поиск противоопухолевых веществ, который продолжается по настоящее время. За это время на основе наиболее активных из них было раз-

работано 20 препаратов синтетического и природного происхождения, которые передавались на клинические испытания (новэмбихин, допан, асалин, сарколизин, колхамин, оливомидин, розевин, фентирин, нитруллин, кортифен, тестифенон, сетремед, метил-ДИК, амотин, ханерол, араноза, платин, циклоплатам, эстразин, терафтал). 10 из них успешно прошли клинические испытания, применялись ранее или применяются в настоящее время. В настоящее время в клинической практике используются разработанные в РОНЦ представители основных классов противоопухолевых цитостатиков: алкилирующие агенты (сарколизин, цифелин), нитрозоалкилмочевины (араноза, лизомустин), платиновый комплекс второго поколения – циклоплатам, воспроизведенный митоксантрон – бисантрон. Проходят клинические испытания кортифен и терафтал [9, 6, 7].

В 1975 году была создана специализированная группа, перед которой была поставлена задача создания Банка данных по противоопухолевым веществам, изучавшимся в РОНЦ, с целью создания новых противоопухолевых лекарств. Направления развития Банка данных соответствовали тенденциям развития как подходов к поиску новых противоопухолевых лекарств, так и информационных технологий.

Начав с простого накопления первичных документов, переходили к созданию картотеки с формализованной информацией и затем компьютерной базы данных (БД).

В настоящее время Банк данных по противоопухолевым веществам имеет трехконтурную структуру, представленную на схеме (рис.1).

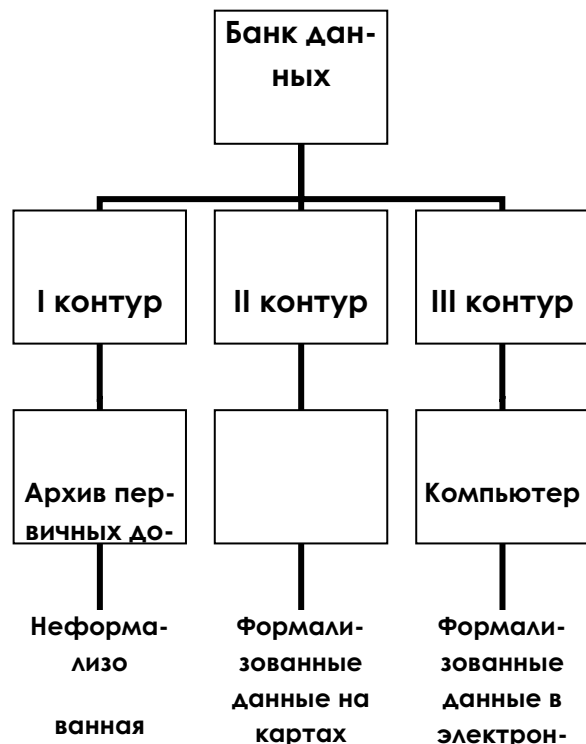


Рис. 1. Трехконтурная структура Банка данных по противоопухолевым веществам

Архив первичных документов (I контур) содержит более 10000 единиц хранения, в основном паспорта на вещества, лабораторные журналы, протоколы исследований и различные отчеты, содержащие преимущественно неформализованную информацию. Систематизированная картотека (II контур) содержит формализованные по определенным правилам данные по строению, свойствам и результатам изучения биологической активности веществ. Организована картотека в соответствии с системным номером-идентификатором, присвоенным веществу при его первичной регистрации в Банке данных. Основные части карты – химический паспорт вещества и результаты биологических испытаний. Картотека является, во-первых, самостоятельной информационно-поисковой системой, во-вторых, архивным массивом предмашинных форматов, использованных при вводе данных в компьютерную БД. Компьютерная БД (III контур) содержит формализованные данные в электронном виде. При создании компьютерной БД использована СУБД (система управления базами данных) ISISBASE MDL Information Systems, Inc. [15].

Структура БД делится на 2 блока: номенклатурно-химический и биологический. Поля номенклатурно-химического блока содержат данные, обычно известные к моменту передачи вещества на биологическое изучение, которые вводятся в БД при первичной регистрации вещества в Банке данных. Это, во-первых, модуль номенклатурных данных, позволяющие однозначно идентифицировать вещество, во-вторых – модуль химических данных, характеризующих химический состав, строение и физико-химические свойства вещества в объеме, необходимом для корректного проведения биологического изучения и полноценного анализа его результатов. Основная часть данных номенклатурно-химического блока получена эмпирическим путем и вводится в БД из паспортов, составленных авторами вещества. Это различные шифры, способ получения, сведения об авторах синтеза или выделения из природного сырья, структурная формула, элементный состав, брутто-формула, молекулярная масса, химические и тривиальные названия на русском и английском языках, химический класс, данные по стерео- и оптической изомерии, температуры кипения и плавления, внешний вид, устойчивость во внешней среде, гигроскопичность, растворимость в различных растворителях, стабильность и условия хранения. Для веществ природного происхождения дополнительно приводятся данные о таксономии организма – источника выделения вещества (семейство, род и вид), месте и времени сбора сырья, способе получения экстракта и его фракций. Есть также данные, генерируемые средствами СУБД ISISBase (химическое название по системе IUPAC, рассчитанный по структурной формуле элементный состав) [2, 5, 10].

Дополнительно в структуру БД введены поля, содержащие данные, характеризующие «лекарствоподобие» или «нелекарствоподобие» вещества, которые по современным представлениям желательно оценивать

как можно раньше, а именно **logP** (логарифм коэффициента распределения в системе октанол – вода, характеризует различную растворимость вещества в двух несмешивающихся растворителях, может быть рассчитан с помощью различных компьютерных программ), **H_Donors** (число донорных водородных связей в молекуле), **H_Accept** (число акцепторных водородных связей в молекуле), **Rot_Bond** (число вращающихся связей в молекуле). Эти простые молекулярные признаки используются в настоящее время для прогнозирования биодоступности вещества при пероральном введении. Идеальными кандидатами для разработки лекарств считаются вещества, удовлетворяющие правилу 5 Липинского, а именно, имеющие молекулярную массу $MW \leq 500$ (оптимальное значение ≈ 350) дальтон, $-2 < \log P < 5$ (оптимальное значение ≈ 3), число акцепторных водородных связей в молекуле < 10 (опт. ≈ 5 , число донорных водородных связей в молекуле ≤ 5 (опт. ≈ 2), число вращающихся связей в молекуле ≤ 5 [14].

Поля биологического блока БД содержат качественные и количественные данные результатов изучения цитотоксической активности в культуре опухолевых клеток, противоопухолевой активности на экспериментальных опухолях животных и общетоксических свойств. Для цитотоксической активности приводятся данные по торможению синтеза ДНК или выживаемости клеток (в %) в присутствии вещества, SE_{50} вместе с условиями опыта, при которых они получены (названия линий клеток, способ оценки цитотоксической активности, время обработки клеток веществом). Для противоопухолевой активности приводятся торможение роста опухоли, увеличение продолжительности жизни, показатели индукции ремиссий и излеченности вместе с названиями опухолевой модели, вида и линии животных, пути и режима введения вещества. Токсичность веществ характеризуется летальными дозами, полученными на лабораторных животных в различных режимах введения [1].

БД фактически представляет собой оцифрованный формализованный обзор многолетних исследований РОНЦ по поиску новых противоопухолевых лекарств. В настоящее время в БД зарегистрировано 11206 веществ, из них синтетических 9488, природного происхождения 1718, имеют корректные структурные формулы 8911. 7492 вещества имеют молекулярную массу ≤ 500 , то есть могут быть кандидатами в лекарства перорального применения. Распределение веществ по химическим классам представлено на диаграмме (рис. 2).

Представляет интерес перекрываемость БД РОНЦ и Национального института рака (НИР) США. К сожалению, точный анализ наличия одинаковых веществ в этих двух БД в настоящее время затруднен из-за отсутствия возможности корректной дифференцировки с помощью структурной формулы формата ISI-Base пространственных особенностей молекулы вещества. В связи с этим вещества, противоположные по стереоизомерии, при компьютерном сравнении определяются как одинаковые. Поиск с помощью тех-

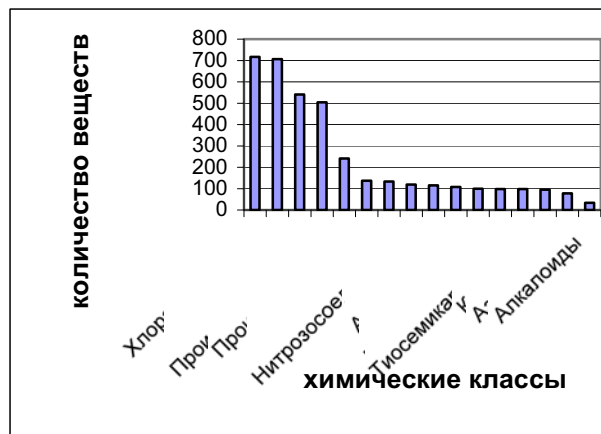


Рис. 2. Основные химические классы веществ, представленных в БД [11]

нологии **Chemical Structure Lookup Service** (<http://cactus.nci.nih.gov/lookup/help.html>), позволяющий искать наличие структурной формулы конкретного вещества в 80 различных БД, содержащих 27 миллионов оригинальных химических структур, показал, что только около 3% структурных формул из БД РОНЦ содержится в открытой БД НИР США, содержащей 250250 веществ (Рис. 3).

Одна из причин перекрываемости БД РОНЦ и НИР США – совместная работа по сравнению систем отбора активных веществ, применяемых в обоих институтах, которая сопровождалась обменом веществами [13].

Наряду с внешними информационными ресурсами (БД НИР США, представленные на сайтах <http://www.dtp.nci.nih.gov/>) и <http://cactus.nci.nih.gov/>), БД РОНЦ может быть использована для оценки оригинальности структуры новых веществ, предлагаемых для изучения биологической активности, принадлежности нового вещества к химическим классам, проявляющим или не проявляющим цитотоксическую или противоопухолевую активность.

Особенностью информации, представленной в БД РОНЦ, является то, что результаты экспериментального изучения биологической активности получены в стандартизованных экспериментальных условиях одного учреждения по одним и тем же методикам и имеют количественный характер. Это придает данным по биологической активности дополнительную цен-

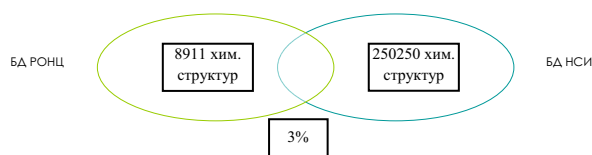


Рис. 3. Содержание оригинальных и одинаковых химических структур в БД РОНЦ и НИР США

ность при их использовании в аналитических исследованиях по связи структура – активность, в том числе в качестве обучающих массивов для систем компьютерного прогнозирования биологической активности веществ по их химической структуре. Данные по химической структуре, цитотоксической и противоопухолевой активности из компьютерной Базы данных РОНЦ использовались для формирования обучающих массивов при прогнозировании активности по структуре вещества с помощью отечественных компьютерных систем BIBIGON (разработана в Институте органической химии им. Зелинского РАН) [3], PASS (разработана в Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН) [4] и ДСМ-метода (Всероссийский институт научной и технической информации) [12]. Обучающие массивы, формируемые на основе выборок из компьютерной Базы данных РОНЦ, позволяют прогнозировать спектр противоопухолевого действия новых химических веществ на 14 различных экспериментальных опухолей.

Анализ информации, содержащейся в БД РОНЦ, с помощью современных информационных технологий позволяет не согласиться с мнением о том, что мы никогда не узнаем того, что некоторые вещества могли бы стать эффективными лекарствами несмотря на то, что они были отвергнуты ранее по результатам экспериментального изучения на опухолевых моде-

лях, чувствительных только к известным в то время препаратам, в связи с тем, что они обладают иным, неизвестным во время их изучения механизмом действия [8].

Так, для ряда веществ, структурные формулы которых содержатся в БД РОНЦ, не показавших противоопухолевой активности при первичном скрининге на перевиваемых лейкозах мышей, и вследствие этого снятых с дальнейшего изучения, с помощью системы PASS получен положительный прогноз наличия у них антиангиогенного действия. Результаты прогноза позволяют предположить у этих веществ активность, не выявленную ранее из-за невозможности выявления на лейкозах противоопухолевой активности, обусловленной антиангиогенным действием, и рассмотреть возможность их повторного тестирования на моделях солидных опухолей, где предполагаемый механизм контроля роста опухоли может быть реализован.

В настоящее время структура БД дополнена полями для ввода данных по результатам компьютерного прогнозирования спектра биологической активности с помощью системы PASS [16]. Это позволяет хранить в одной записи как данные, уже имеющиеся в базе, в том числе по результатам изучения биологической активности, и результаты прогноза. Специально созданные интерфейсы позволяют просматривать их одновременно, что облегчает анализ (Рис. 4).

[illegible]

Рис. 4. Пример одновременного представления структурной формулы, результатов биологического изучения и прогноза спектра биологической активности вещества

Таким образом, БД по противоопухолевым веществам может эффективно использоваться в качестве информационно-технологического ресурса при поиске новых веществ с противоопухолевой активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Апрышко Г.Н. Биологическая информация в электронной базе данных по противоопухолевым веществам НИИ ЭДИТО РОНЦ РАМН // Вестник РОНЦ. — 2007. — № 2. — С.25-31.
2. Апрышко Г.Н. Информационная система РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН по противоопухолевым агентам. Общий обзор // НТИ. Сер. 2. — 2007. — №1. — С.18-22.
3. Апрышко Г.Н., Кумсков М.И. Решетникова В.В., Маслова Л.К. Пономарева Л.А. База данных по противоопухолевым препаратам для изучения связи «СТРУКТУРА-АКТИВНОСТЬ» // Материалы 6-ой Международной конференции «Распознавание образов и анализ изображений: новые информационные технологии» РОАИ-6-2002, Великий Новгород, РФ, 21-26 октября 2002. — Великий Новгород, 2002. — С.39-40.
4. Апрышко Г.Н., Порошков В.В., Филимонов Д.А. Компьютерный Прогноз Спектра Противоопухолевой Активности// Тезисы Докладов XII Российского Национального Конгресса «Человек И Лекарство», М., 2005. — С.636.
5. Апрышко Г.Н., Решетникова В.В. Регистрационно-номенклатурный и химический модули электронной базы данных Информационной системы по противоопухолевым агентам // НТИ. Сер.2. — 2007. — №6. — С.24-31.
6. Герасимова Г.К. Итоги сотрудничества экспериментальных и клинических отделов химиотерапии РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН (1952-2000 гг.) // Вопросы онкологии. — 2001. — Т.47. — №6. — С.722-727.
7. Герасимова Г.К., Апрышко Г.Н. Развитие систем и методов отбора веществ с противоопухолевыми свойствами в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН // «Экспериментальная онкология на рубеже веков». — Под ред. М.И.Давыдова, А.Ю.Барышникова. М., Издатель-
- ская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. — С.59-84.
8. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. М., «Практическая медицина». — 2006. — 512 с.
9. Ларионов Л.Ф., Манкин З.В. Биологические и химические способы лечения рака // Злокачественные опухоли. — Т.1, ч.2. — Под ред. Петрова Н.Н. — Л., Медгиз, 1948. — С.117-152.
10. Решетникова В.В., Апрышко Г.Н. Номенклатурно-химическая информация в Банке данных по противоопухолевым веществам ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН // Вестник РОНЦ. — 2007 — №3. — С.9-14.
11. Решетникова В.В., Апрышко Г.Н., Герасимова Г.К. Изучение веществ разных химических классов в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН по данным информационной системы по противоопухолевым агентам // Российский биотерапевтический журнал. — 2006. — № 4. — С.84-88.
12. Самохин М.В., Апрышко Г.Н., Горюнова О.В., Плихтяк И.Л., Решетникова В.В. Прогнозирование биологической активности гликозидов бисиндолов и индолокарбазолов на основе представления молекул помеченными графами с учетом пространственной изомерии. // Тез. докл. XIII Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва, 2006. С. 35.
13. Экспериментальная оценка противоопухолевых веществ в СССР и США / Под ред. Софьиной З.П., Сыркин А.Б., Голдин А. и др. — М.: Медицина, 1980. — 179 с.
14. C. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // Adv. Drug. Deliv. Res. — 1997/ — №23. — P.3-25.
15. <http://www.mdli.com/products/framework/isis>
16. Poroikov V., Filimonov D. PASS: Prediction of Biological Activity Spectra for Substances. In: Predictive Toxicology. Ed. by Cristoph Helma. N.Y.: Taylor & Frensis, 2005. — P.459-478.

О.Н. Коборова¹, Д.А. Филимонов¹, А.В. Захаров¹, А.А. Лагунин¹, А. Кель², Ф. Колпаков³,
Ю.В. Кондрахин³, Р. Шарипов^{3,4}, В.В. Поройков¹

ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ МИШЕНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва
²BIOBASE GmbH, Halchtersche Strasse 33, D-38304 Wolfenbüttel, Germany

³Институт системной биологии, Новосибирск

³Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Регуляция клеточного цикла (РКЦ) – сложный процесс, в который вовлечено множество белков различной активности и специфичности. Нарушение регуляции ведет к тяжелым заболеваниям, в частности, к возникновению злокачественных опухолей, среди которых одной из наиболее часто встречающихся является опухоль молочной железы [1]. Идентифицировать белки, которые участвуют в возникновении и развитии злокачественных новообразований, и отобрать среди них наиболее перспективные в качестве мишеней для противоопухолевой терапии – одна из наиболее актуальных задач современной медицины [2].

Отображением РКЦ являются регуляторные сети (РС), которые представляют собой набор известных на данный момент взаимодействий между генами и/или белками. Существуют различные методы анализа РС, которые совмещают теорию графов и статистические методы [3]. Например, ищут подсети, состоящие из десятков белков и генов, нарушения функций которых вносят существенный вклад в возникновение и развитие определенного заболевания, но то, какие именно белки, гены, белковые комплексы в исследуемой подсети являются перспективными мишенями для разработки новых противоопухолевых препаратов, остается неясным.

Наш метод основан на анализе РС взаимодействий из базы данных TRANSPATH® (<http://www.biobase.de>), содержащей информацию о сигнальных молекулах, их реакциях и путях, которые состоят из этих реакций [4]; и данных об экспрессии генов из базы данных Cyclonet (<http://cyclonet.biouml.org>), которая также содержит разнобразную информацию о РКЦ млекопитающих в норме и при патологиях [5].

В связи с тем, что доступных данных о константах скоростей и концентрациях белков слишком мало, а имеющиеся, приведенные в различных публикациях, порой противоречат друг другу, мы рассматриваем РС в упрощенном виде. Каждый ген и соответствующий ему белок представлены в виде вершин ориентированного графа, ребро между двумя вершинами проводится тогда и только тогда, когда между соответствующими генами и/или белками имеется взаимодействие.

Каждая вершина в графе находится в одном из двух состояний: активном и неактивном. В нашей модели для гена активное состояние соответствует тому,

что ген может экспрессироваться, для белков – тому, что белок может осуществлять свою функцию. Входными данными являются состояния вершин (белков и/или генов) в начальный момент времени.

Моделирование процесса регуляции состоит в вычислении последовательности состояний узлов сети $S(0), S(1), S(2), \dots$ из заданного начального состояния $S(0)$ посредством набора логических функций. Последовательность $S(0), S(1), S(2), \dots$ будем называть траекторией. Время при таком подходе дискретно, за один шаг (один момент времени) вычисляются состояния вершин в зависимости от состояний вершин на предыдущем шаге.

Разработанный нами метод реализован в компьютерной программе NetFlowEx (Net Flow Explorer) на языке Java. В качестве апробации нашего метода для моделирования был выделен участок РС (TRANSPATH®), отражающий хорошо изученный механизм апоптоза [6]. На основе анализа РС и данных об экспрессии при раке молочной железы (Cyclonet) происходит расчет состояний сети в различные моменты времени, и выполняется проверка перехода клетки в состояние апоптоза (считается, что апоптоз наступает, когда активируются каспазы и процесс становится необратимым). Если апоптоз не наступил, то происходит инактивация вершин по одной, две или три, и пересчет состояний сети с учетом исключений. Если в процессе моделирования, при инактивации какой-либо вершины происходит активация каспаз, то такая вершина рассматривается в качестве перспективной мишени, воздействие на которую может быть использовано для терапии данного вида опухоли. Этот процесс происходит до тех пор, пока не будет осуществлен перебор всех комбинаций инактивируемых вершин.

Результаты

Как было сказано выше, метод применен на участке малой РС, которая состоит из 85 вершин (73 белков, 7 белковых комплексов и 5 генов) и 117 ребер, а именно: из каскада каспаз, участка пути TNF α , каскада митоген-активированных киназ в ответ на стресс, CHK киназ, а также включает белки p53, BRCA1 и другие, ответственные за переход клетки в апоптоз и ее выживание при стрессе.

Было показано, что наша модель воспроизводит процессы регуляции деления клетки в норме, если в качестве начальных состояний в РС используются белки, активные в здоровых делящихся клетках (PDK1, Cyclin B:CDK1, FZR) [7-9].

Также показано, что для белков, активных при повреждениях ДНК и стрессе: ATR, ATM, BRCA1 [10], построенная модель воспроизводит процесс апоптоза в здоровой клетке.

Кроме того, мы показали, что модель не противоречит патологическим процессам при опухоли молочной железы. Для этого из Cyclonet были взяты данные о пониженной и повышенной экспрессии генов в случае генерализованного рака молочной железы.

Для выявления белков, воздействие на которые наиболее существенно изменяет траектории желательным образом – наступление апоптоза – состояние соответствующих определенному белку вершин фиксируется согласно виду предполагаемого воздействия. Путем инактивирования вершин РС был выявлен белок PIN1 (рис. 1, А), а при инактивировании всех возможных пар вершин – пара белков PLK1 и MDM2 (рис. 1, Б). Из рис. 1, А виден результат ингибирования PIN1. PIN1 активен при патологии и неактивен в норме, ингибирует CDC25 – активатор циклинзависимой киназы 1 (Cdk1) и комплексов cyclin A:Cdk2, cyclin E:Cdk2 [11]. Активными в начальный момент времени были следующие белки: CHK1, Mdm2, PLK1, PDK1, Cyclin B:CDK1, Cyclin B, FZR, PCNA, PP2C (на рис. 1, А $S_3(0)$, $S_7(0)$, $S_{42}(0)$, $S_{43}(0)$, $S_{50}(0)$, $S_{52}(0)$, $S_{54}(0)$, $S_{59}(0)$, $S_{83}(0)$, соответственно). В последующие моменты времени стали активными другие участники сети, и апоптоз наступил (черный цвет).

На рис. 1, Б изображен результат ингибирования пары MDM2 и PLK1. MDM2 – убиквитин лигаза ингибирует и деградирует p53 [12], а PLK1 – киназа также ингибирует p53, активирует циклосому (источник циклинов) и CDC25 [13]. Активными в начальный момент времени были белки: CHK1, PDK1, Cyclin B:CDK1, Cyclin B, FZR, PCNA, PIN1, PP2C (на рис. 1, Б $S_3(0)$, $S_{43}(0)$, $S_{50}(0)$, $S_{52}(0)$, $S_{54}(0)$, $S_{59}(0)$, $S_{60}(0)$, $S_{83}(0)$, соответственно). Из рис.1, Б видно, что апоптоз также наступил (черный цвет).

Следует отметить, что для каждого из найденных белков известны лиганды, которые находятся на разных стадиях тестирования специфической активности *in vitro* (лиганды для PLK1 и PIN1) [14,15] и доклинических испытаний (лиганды для MDM2) [16], что в свою очередь, подтверждает адекватность полученной модели.

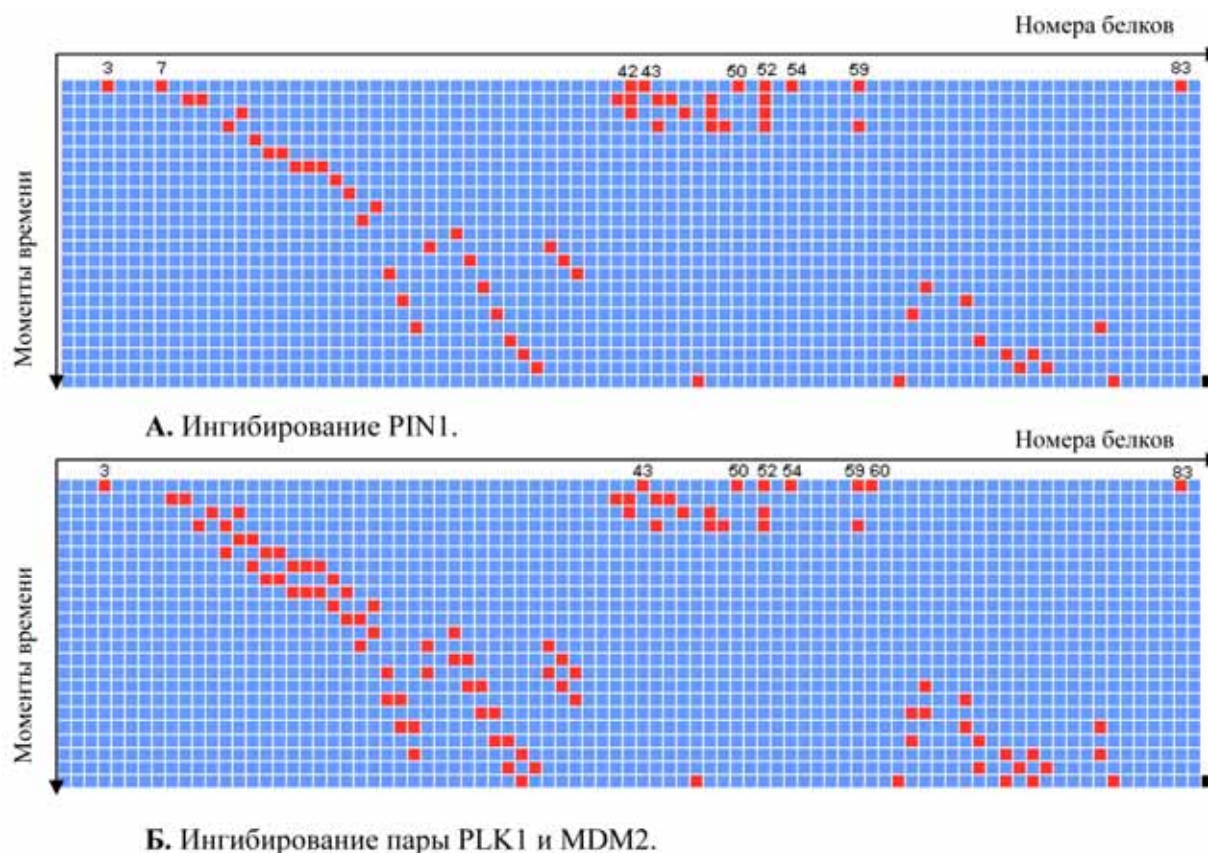


Рис. 1. Результат моделирования патологических процессов в генерализованном случае рака молочной железы:

Красный цвет – активные белки, голубой цвет – неактивные белки, черный цвет – переход клетки в апоптоз.

Используя NetFlowEx, промоделировано ингибирование вершин по одной, в результате которого, во всех трех видах опухолей были выявлены две общие мишени XIAP и cIAP-2. XIAP - ингибитор для каспаз 7 и 3, и активатор p38 α , а p38 α – ингибитор каспаз 3 и 8, участник каскада передачи сигнала деления через митоген-активированные киназы; cIAP-2 - также ингибитор каспаз 7 и 3. Это уже третья общая мишень.

Также проанализирован большой участок РС, который состоит из 8829 вершин и 13613 ребер. При этом использованы данные о генной экспрессии следующих распространенных видов опухолей молочной железы: инвазивной карциномы эпителия протоков; HER2/neu-положительных карцином и положительных по прогестероновому рецептору карцином.

В HER2/neu-положительных карциномах выявлены еще две мишени. Первая – киназа АКТ, которая влияет на множество белков, в том числе активирует CREB – транскрипционный фактор, активатор экспрессии онкогена c-fos и регулятор экспрессии онкогена c-jun. Также АКТ фосфорилирует андрогеновый рецептор (NR3C4) в ответ на инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), ингибирует его связывание с кофакторами и, как следствие, уменьшает экспрессию ингибитора циклинов p21. А при индуцированной активации через ILK (интерлейкин-связанную киназу), АКТ киназа ингибирует апоптоз [17].

Вторая мишень в HER2/neu-положительных карциномах – это STAT5A –транскрипционный фактор, активатор множества генов – среди них: циклин D1 и D2, онкоген c-fos, IGF-1, ген эстрогенового рецептора 1 (ER α) [18]. Все эти гены принимают непосредственное участие в регуляции деления клетки и переходах между фазами клеточного цикла. В настоящее время белки АКТ и XIAP исследуются в качестве мишеней для противоопухолевых препаратов [19, 20].

Заключение

Нами разработан алгоритм выявления перспективных противоопухолевых мишеней и их сочетаний, который обеспечивает анализ РС и доступных для большого количества белков данных об их генной

экспрессии. Предварительные результаты апробации данного алгоритма на большом участке регуляторной сети указывают на применимость метода для поиска новых мишеней: из четырех найденных мишеней две (АКТ и XIAP) уже исследуются в качестве мишеней для противоопухолевых препаратов.

Работа поддержана грантом FP6 LSHB-CT-2007-037590 (Net2Drug).

ЛИТЕРАТУРА

1. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2007.
2. Li Q., Xu W. (2005) *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*, 5:53-63.
3. Ekins S. et al. (2005) *Drug Discovery Handbook*, 141-142.
4. Krull M. et al. (2006) *Nucleic Acids Research*, 34: 546–551.
5. Kolpakov F. et al. (2007) *Nucleic Acids Research*, 35: 550-556.
6. Lalier L. et al., (2007) *Apoptosis*, 12(5):887-896.
7. Toker A. (2000) *Mol. Pharmacol.*, 57:652-658.
8. Lundberg A. S., Weinberg R. A. (1999) *Eur. J. Cancer*, 35:531-539.
9. Peters J.-M. (1999) *Exp. Cell Res.*, 248:339-349.
10. Foray N. et al. (2003) *EMBO J.*, 22:2860-71 (2003).
11. Shen M. et al. (1998) *Genes Dev.*, 12:706-720.
12. Kussie P. H. et al. (1996) *Science*, 274:948-953.
13. Kraft C. et al. (2003) *EMBO J.*, 22:6598-6609.
14. *Drud Data Rep.* (2005) 27(1): 92.
15. Yuasa, T. et al. (2006) *J. Urol.*, 175 (4, Suppl.)
16. Magrini, R. et al. (2007) *Pro. Am. Assoc. Cancer Res. (AACR)*, 48.
17. Cardone M. H. et al. (1998) *Science*, 282:1318-1321.
18. Brizzi M. F. et al. (1999) *Mol. Biol. Cell*, 10:3463-3471.
19. Petroulakis E. et al. (2006) *Br. J. Cancer.*, 94(2):195-199.
20. Hu Y. et al. (2003) *Clin. Cancer Res.*, 9(7):2826-2836.

А.Э. Воронков, И.И. Баскин, В.А. Палюлин, Н.С. Зефилов

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ДИЗАЙН ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ WNT-FRIZZLED ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Московский государственный университет, им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва

Семейство Wnt белков и их рецепторы играют важную роль в процессах дифференцировки и развития стволовых клеток, в развитии онкологических заболеваний. Сигнальный путь Frizzled-Wnt влияет на экспрессию ключевых генов, регулирующих клеточный цикл. Белки Wnt взаимодействуют с доменом, обогащенным цистеином (CRD) Frizzled-рецепторов. В данной работе нами были сконструированы молекулярные модели Wnt-белков и CRD-доменов Frizzled-рецепторов, а также молекулярная модель комплекса hWnt8-белка и димерного CRD-домена Frizzled рецепторов. С использованием структуры этого комплекса нами были локализованы сайты связывания на поверхности других представителей семейств Wnt и Frizzled-белков человека. На основе аминокислот, участвующих в образовании комплекса были предложены пептидомиметики, имитирующие CRD-домен Frizzled-рецепторов и Wnt-белок человека в комплексе. По подобию с этими пептидомиметиками был осуществлен поиск по базе данных компании ХИМРАР, и полученная выборка была использована как база данных для виртуального скрининга через потенциальные сайты связывания на поверхности Wnt-белков и Frizzled-рецепторов. Для лучших результатов скрининга осуществлены модификации, которые потенциально должны улучшить их связывание с биомишенью.

СТЕНДОВАЯ СЕССИЯ

В.Н. Азев¹, Н. Чакраборти², С. Сузуки³, М. д'Аларко²

СИНТЕТИЧЕСКИЙ ПАЛЬМИТОИЛИРОВАННЫЙ ИНОЗИТ-ГЛИКАН, ПОЛУЧЕННЫЙ С ЦЕЛЬЮ ПОИСКА НОВЫХ АНТИДИАБЕТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ, СЕЛЕКТИВНО УБИВАЕТ РАКОВЫЕ КЛЕТКИ

¹Исследовательский институт химического разнообразия, Химики

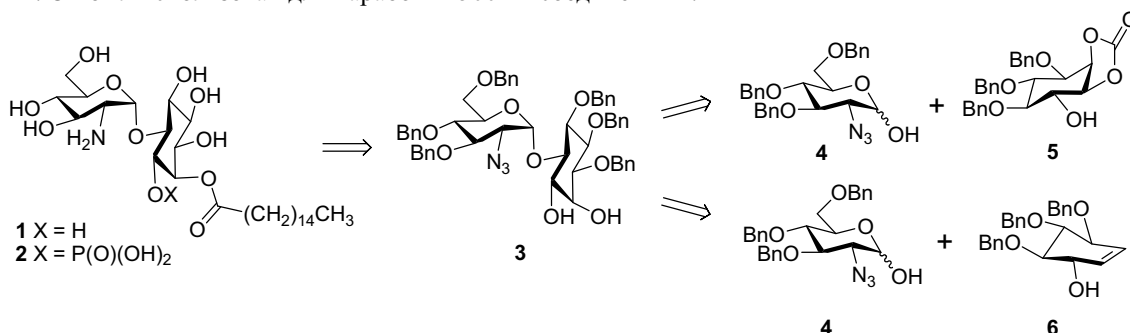
²Тафтский университет, Мэдфорд, США.

³Департамент молекулярного метаболизма и диабета,

Медицинская школа универси-тета Тохоку, Сейрио-Мачи, Аоба-Ку, Сендай-ши, Япония.

Считается, что инозитфосфатные гликаны (ИФГ) являются вторичными передатчиками в сигнальных путях различных гормонов, в том числе инсулина. Их химическая структура до сих пор не установлена, за исключением одной. Однако, существует гипотеза о родстве структур ИФГ и другого класса олигосахаридов, называемых гликозилированными фосфатидинозитами (ГФИ).

В соответствии с этой гипотезой были получены синтетические ИФГ (или ИФГ-модели), в частности, с целью получения новых антидиабетических препаратов. Некоторые из полученных ИФГ-моделей оказались инсулиномиметиками. Несколько известных ГФИ содержат в своей структуре остатки жирных кислот. С целью поиска новых, более активных ИФГ мы предложили синтез двух пальмитоилированных И(Ф)Г-моделей (**1** и **2**). Для их синтеза мы использовали два подхода, которые отличались структурой предшественника инозитольного кольца (**5** и **6**). Метод, в котором использовался кондуриitol **6**, оказался более эффективным. Он был использован для наработки 500 мг соединения **1**.



1 и **2** оказались инсулиномиметиками: они стимулировали биосинтез липидов и гликогена. В ходе биологических испытаний мы случайно обнаружили токсичность соединения **1** к нескольким линиям раковых клеток, но не к нормальным клеткам.

П.Г. Кислицын¹, Виллем Ван Оттерло², Александр Корниенко³

НОВЫЙ ПОДХОД К СИНТЕЗУ ПАНКРАТИСТАТИНА

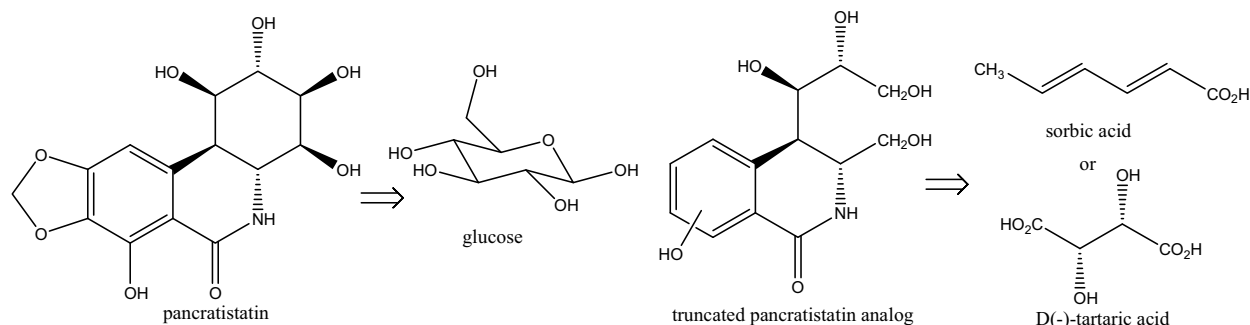
¹Исследовательский институт химического разнообразия, Химики

²Университет Витватерсранда, Йоханнесбург, ЮАР

³Институт Нью Мексико горного дела и технологии, Сокорро, США

Панкратистатин, выделенный из луковиц *Pancreaticum littorale*, проявляет весьма высокую противораковую и противоопухолевую активности. Однако доклинические исследования существенно тормозятся ограниченным количеством вещества, выделяемым из природного источника и сложной структурой алкалоида, что затрудняет его синтез. В литературе появлялись статьи по синтезу панкратистатина и исследованию его противораковой активности *in vitro*, но систематических исследований структура-свойство (SAR) не проводилось. Недостаточное понимание природы изокарбостирильного фармакофора затрудняет дизайн аналогов

панкратистатина, предназначенных для исследования биологической активности. Для решения этой проблемы мы предлагаем практичный способ синтеза панкратистатина и его аналогов с различной структурой ароматического кольца, а также с усеченным строением циклитола. Этот подход основан на высокой антидиастереоселективности сопряженного присоединения арилкупратов к ненасыщенным эфирам. Последние получают из доступных веществ: глюкозы, сорбиновой и D(-)-винной кислот.



Т.М. Кулинич¹, Е.И. Филясова¹, А.М. Шишкин¹, Л.С. Агапова², В.К. Боженко¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ ХИМЕРНОГО ПЕПТИДА, СОДЕРЖАЩЕГО ФРАГМЕНТ Р16INK4a И ИНТЕРНАЛИЗУЕМУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ ANTENNAPEPIA

ФГУ РНЦРР Росмедтехнологий, Москва

** НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва*

Целью работы являлось исследование цитостатических и цитотоксических свойств интернализуемого химерного пептида, содержащего фрагмент ингибитора циклиновых киназ p16INK4a и интернализуемую последовательность Antp, являющуюся участком трансдукционного белка Antennapedia из *Drosophila melanogaster*. Работа была выполнена на культурах клеток человека 293, A549, MCF-7 и на первичных культурах клеток человека, полученных из операционного материала тканей рака молочной железы, рака почки и неизменной ткани почки. Изменение уровня апоптоза и изменение распределения клеток по фазам клеточного цикла исследовали методом проточной цитофлуориметрии. Также были проведены эксперименты *in vivo* на мышах *nude* с перевитыми клетками человека линий A549 и HCT-116. Введение мышам химерного пептида начиналось при обнаружении пальпируемого опухолевого узла (2-4 мм), пептид pAntp_p16INK4a вводился в дозах 0,1 мг и 0,2 мг подкожно в район опухолевого узла.

Добавление пептида pAntp_p16INK4a в концентрации 40 мкМ к культурам клеток приводило к задержке перехода G1 – S фаз клеточного цикла. При инкубации клеток с пептидом наблюдалось увеличение уровня апоптоза. Наименее чувствительной к воздействию пептида оказалась культура клеток рака молочной железы человека MCF-7. Рак молочной железы также был менее чувствителен к цитотоксическому действию пептида по сравнению с раком почки. На неизменную ткань почки пептид не оказывал цитотоксического эффекта. В экспериментах на мышах было показано, что инъекция pAntp_p16INK4a в место опухолевого узла приводила к снижению темпов роста опухоли и к снижению смертности животных. Полученные данные позволяют рассматривать интернализуемый химерный пептид pAntp_p16INK4a в качестве потенциального противоопухолевого препарата.

А.Р. Мехтиев, Г.Е. Морозевич, Н.И. Козлова, И.Б. Чеглаков, В.И. Федченко, А.Ю. Минарин

22,23-ОКСИГЕНИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ СТИГМАСТАНА И ЭРГОСТАНА ВЫЗЫВАЮТ ГИБЕЛЬ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ MCF-7

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва

Введение

Изучение влияния оксигенированных производных холестана (оксистеринов) на жизнеспособность, рост, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток млекопитающих в культуре обсуждалось в многочисленных обзорах [1-6]. Биологическая активность продуктов окисления других стеридов исследована гораздо меньше. Продукты окисления эргостерина ингибировали рост и вызывали апоптоз в клетках MCF-7 и MDA-231 [7]; (22E)-5 α ,8 α -эпидиоксиэргоста-6,22E-диен-3 β -ол подавлял рост клеток HL60 [8]; (22E)-эргоста-7,22-диен-3 β ,5 α ,6 β -триол влиял на эстроген-индуцированный апоптоз в остеобластах мыши линии MC3T3-E1 [9]. Продукты окисления кампестерина и β -ситостерина были умеренно токсичны для линейных моноцитов, моноцитарных макрофагов, клеток карциномы кишечника CaCo2 и гепатомы Нер G2 [10-12].

В литературе отсутствуют данные о цитотоксичности производных эргостана и стигмастана, содержащих оксигенированную боковую цепь. С другой стороны, многие стериды природного происхождения, содержащие оксигенированную боковую цепь, проявляют высокую токсичность в быстро пролиферирующих клетках и обладают высоким фармакологическим потенциалом [13-17].

Недавно в нашей лаборатории был осуществлен синтез серии новых производных эргостана и стигмастана, содержащих оксигенированную боковую цепь [18,19]. Целью данной работы является изучение цитотоксичности соединений (I – V) в клетках карциномы молочной железы человека линии MCF-7 – стандартной клеточной модели для первичного скрининга новых соединений с противораковой и противоопухолевой активностью.

Используемые сокращения: МТТ – (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид; PBS – фосфат-содержащий физиологический раствор; FCS – эмбриональная сыворотка теленка; ТХУ – трихлоруксусная кислота; PrI – пропидиум иодид; BSA – бычий сывороточный альбумин.

Материалы и методы

Химические реактивы и растворители получены от фирм “Aldrich” и “Sigma”; культуральный пластик от “Greiner”, “Costar” и “Corning”, среды и эмбриональная сыворотка теленка от “Gibco BRL” и “HyClone”; (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидрокси-стигмаст-5-ен (I), (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидрокси-стигмаст-5-ен-7-он

(II), (22R,23R)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (III), (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидрокси-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (IV) и (22S,23S)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (V) синтезированы по методам [18,19].

Клетки карциномы молочной железы человека линии MCF-7, полученные из Американской Коллекции Клеток и Тканей (ATCC), культивировали в 96-луночных, 24-луночных, 6-луночных планшетах или чашках Петри при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в среде DMEM с 10% FCS. Для проведения опытов в отсутствие FCS клетки перед экспериментом выдерживали 24 ч в безсывороточной среде. Исследуемые соединения добавляли к культуральной среде в этанольном растворе, содержание этанола во всех опытах, включая соответствующие контроли, составляло 0,4%.

Определение жизнеспособности клеток реакцией с МТТ [20]. Клетки MCF-7 инкубировали в 96-луночных планшетах в безсывороточной среде или в среде, содержащей 10% FCS, в присутствии исследуемых соединений в различных концентрациях в течение необходимого времени. Культуральную среду удаляли, в каждую ячейку добавляли 125 мкл PBS, содержащего МТТ (1 мг/мл) и клетки инкубировали 4 ч при 37°C. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 125 мкл раствора 0.1 М HCl в PrOH, содержащего 10% тритона X-100. Через 2 ч в каждой ячейке измеряли оптическое поглощение при 540 нм и 690 нм. Показание МТТ-теста (разность поглощения при 540 нм и 690 нм) усредняли по шести независимым определениям. Показание МТТ-теста в отсутствие исследуемых соединений принимали за 100%.

Определение жизнеспособности клеток по включению [¹⁴C]тимидина в ДНК [21]. Клетки MCF-7 в 24-х луночных планшетах инкубировали 24 ч в среде, содержащей кетостерин (III) в различных концентрациях, [¹⁴C]тимидин (1 мКи/мл) и 10% FCS, а затем 1 ч в среде с 10% FCS. Клетки промывали PBS (2х0,5 мл), к каждой пробе добавляли 100 мкл 0,05% раствора BSA и 0,5 мл 6% раствора ТХУ и выдерживали 1ч при 40C. Полученные лизаты переносили на мембранные фильтры «Synpro» (диаметр пор 0,85 мкм), фильтры промывали 6% раствором ТХУ (2х2 мл), сушили и радиоактивность измеряли в сцинтилляторе «Unisolv» на приборе Tri-Carb 2800 TR (Perkin Elmer).

Проточная цитофлуориметрия. Анализ проводили как в работе [22]. Клетки MCF-7 в 6-луночных

планшетах инкубировали 48 ч в присутствии 10% FCS с исследуемыми соединениями, затем клетки обрабатывали 2 мл раствора Версена, затем 0,7 мл 0,25 % раствора трипсина и, после выдерживания при 37°C в течение 1 мин, суспендировали в 1 мл среды. Клетки центрифугировали 3 мин при 1500 об/мин, промывали PBS (2 X 3 мл), обрабатывали 0,5 мл 70% EtOH, и хранили при -20°C. Перед экспериментом клетки промывали PBS (2x3 мл) и встряхивали 0,5 мин в 0,5 мл PBS, содержащего PrI (25 мкг), FCS (0,5%), РНКа-зу А (25 мкг), детергент NP 40 (15 мкг) и выдерживали 30 мин при 4°C. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSAria в режиме FL1.

Микрофотографии клеток MCF-7 (фазовый контраст). Клетки MCF-7 в 35 мм чашках инкубировали 48 ч в присутствии 10% FCS с исследуемыми соединениями. Микрофотографии получали на приборе Axiovert 200M (Zeiss).

Результаты и обсуждение

Оценку цитотоксичности новых оксигенированных производных стигмастана и эргостана (**I – V**) проводили в клетках карциномы молочной железы человека линии MCF-7. Инкубацию клеток с оксистер-

ринами (**I – V**) проводили в безсывороточной среде в течение 48 ч; о жизнеспособности клеток судили по цветной реакции [20], основанной на митохондриальном восстановлении тетразолиевого красителя (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил])-2,5-дифенилтетразолий бромида (МТТ) в интенсивно окрашенный формазан. Этот метод показывает хорошую корреляцию с количеством живых клеток, пролиферацией и активностью ферментов митохондриального матрикса [23-26]. Результаты влияния соединений (**I – V**) на жизнеспособность клеток MCF-7 представлены на рисунке 2.

Соединения (**I – III**) существенно подавляли жизнеспособность клеток MCF-7. Наибольшей токсичностью обладал (22R,23R)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (**III**), рассчитанное значение TC_{50} составляло 0.4 ± 0.1 МКМ. В отличие от цитотоксичного (22R,23R)-эпоксида (**III**), изомерный (22S,23S)-эпоксид (**V**) слабо подавлял жизнеспособность клеток MCF-7. Очевидно, что структура и стереохимическая конфигурация боковой цепи оказывает существенное влияние на цитотоксичность $\Delta 8(14)$ -15-кетопроизводных эргостана. Триол (**IV**), эффективно подавляющий жизнеспособность клеток Нер G2 [18], в клетках MCF-7 проявлял слабую токсичность.

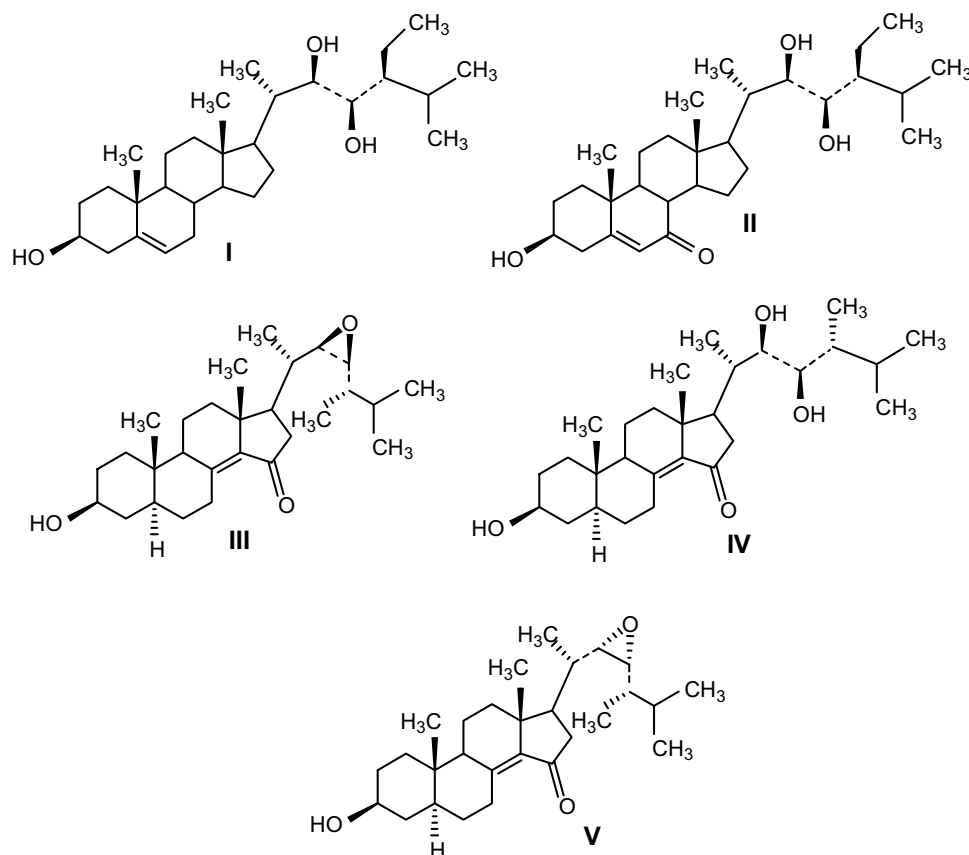


Рис. 1. Оксигенированные производные стигмастана и эргостана: (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидроксистигмаст-5-ен (**I**), (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидроксистигмаст-5-ен-7-он (**II**), (22R,23R)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (**III**), (22R,23R)-3 β ,22,23-тригидрокси-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (**IV**) и (22S,23S)-3 β -гидрокси-22,23-оксидо-5 α -эргост-8(14)-ен-15-он (**V**).

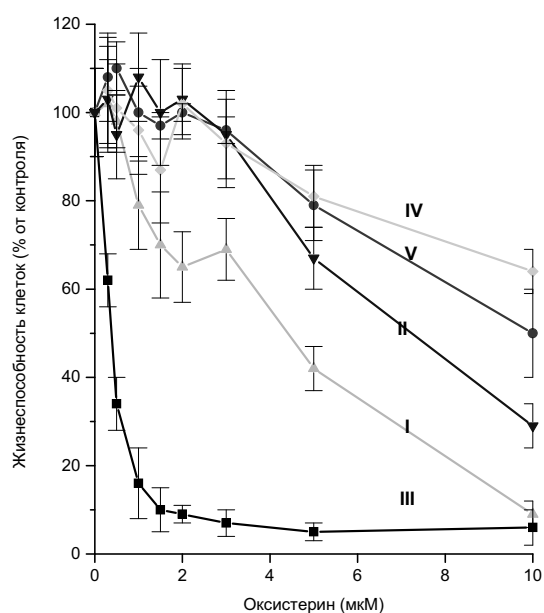


Рис. 2. Влияние оксигенированных производных стигматана и эргостана на жизнеспособность клеток MCF-7 при 48 ч инкубации в безсывороточной среде по данным МТТ (номера кривых соответствуют номеру соединений).

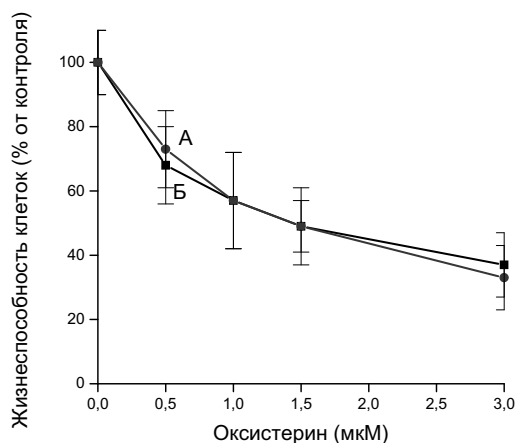


Рис. 3. Влияние (22R,23R)-3В-гидрокси-22,23-оксидо-5А-эргост-8(14)-ен-15-она (III), на жизнеспособность клеток MCF-7 при 24 ч инкубации в среде, содержащей 10% FCS по данным МТТ (А) и по включению [¹⁴С]тимидина в ДНК (Б).

Среди оксигенированных производных стигматана [19] в клетках MCF-7 заметной токсичностью обладали лишь соединения, содержащие (22R,23R)-22,23-диольную группировку (I) и (II).

Токсичность кетостерина (III) в клетках MCF-7 на порядок превосходила оксичность известных оксистерин [27] и была сравнима с активностью природных соединений стероидного ряда, используемых в качестве цитотоксических и цитостатических противоопухолевых лекарственных препаратов [28,29]. Условия инкубации оказывали значительное влияние на токсический эффект соединения (III) в клетках MCF-7. Влияние соединения (III) на жизнеспособность клеток MCF-7 в присутствии 10% FCS показано на рисунке 3. Оценка цитотоксичности кетостерина (III), проведенная с использованием МТТ, полностью совпадала с результатами подавления этим соединением синтеза ДНК в клетках MCF-7.

Эффект соединения (III) в различных концентрациях при различных временах инкубации в присутствии 10% FCS на жизнеспособность клеток MCF-7 показан на рисунке 4. В данном эксперименте клетки MCF-7 выдерживались: 1) 4 ч в присутствии соединения (III), а затем 20 ч в отсутствии соединения; 2) аналогично 6 ч и 18 ч; 3) аналогично 12 ч и 12 ч; и 4) 24 ч в присутствии соединения (III). Графики показывают, что токсический эффект кетостерина зависит от концентрации, достигает максимального значения в первые 12 ч инкубации и не развивается, если клетки прединкубированные с кетостерином (III), в дальнейшем инкубируются в отсутствие этого соединения.

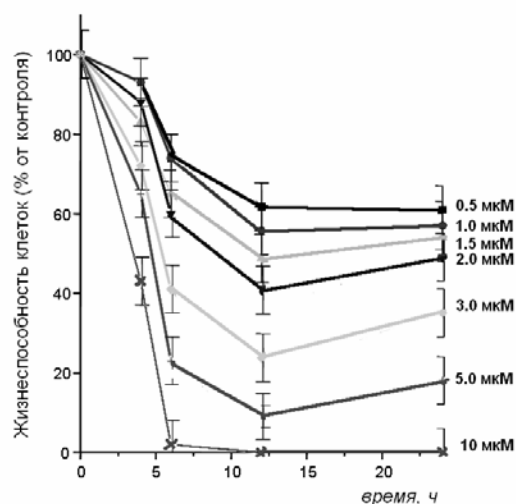


Рис. 4. Зависимость токсического эффекта (22R,23R)-3В-гидрокси-22,23-оксидо-5А-эргост-8(14)-ен-15-она (III) в клетках MCF-7 от времен инкубации в среде, содержащей 10% FCS (по данным МТТ).

Инкубация клеток MCF-7 с наиболее токсичными оксистеринами этой серии (I) и (II) сопровождалась нарушениями конfluентности монослоя, снижением числа прикрепленных клеток и морфологическими изменениями, а также изменением профиля цитофлуориметрического анализа (рис. 5 и 6).

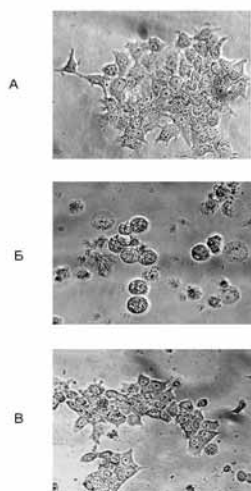


Рис. 5. Микрофотографии клеток MCF-7 (фазовый контраст). Клетки MCF-7 в отсутствии оксистероинов (контроль) – А; в присутствии (22R,23R)-3B,22,23-тригидрокси-стигмаст-5-ена (**I**) – Б; в присутствии (22R,23R)-3B-гидрокси-22,23-оксидо-5А-эргост-8(14)-ен-15-она (**III**) – В.

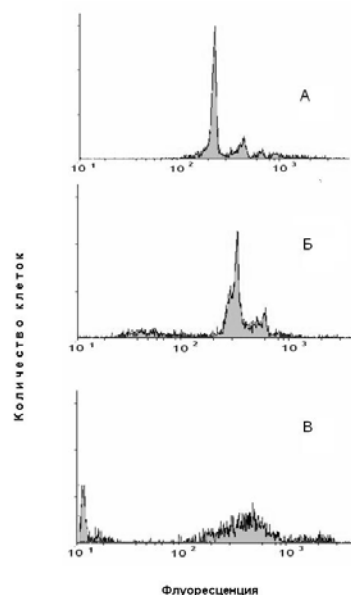


Рис. 6. Анализ клеток MCF-7 методом проточно цитофлуориметрии. Клетки MCF-7 в отсутствии оксистероинов (контроль) – А; в присутствии (22R,23R)-3B,22,23-тригидрокси-стигмаст-5-ена (**I**) – Б; в присутствии (22R,23R)-3B-гидрокси-22,23-оксидо-5А-эргост-8(14)-ен-15-она (**III**) – В

Полученные результаты указывают, что введение в боковую цепь производных стигмастана и эргостана кислородсодержащих заместителей является перспективным подходом к созданию новых биологически активных соединений, в частности к получению соединений, обладающих высокой цитотоксичностью в клетках опухолей.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 06-04-48803).

ЛИТЕРАТУРА

- Schroepfer, G.J., Jr. *Physiol. Rev.* 2000, 80, 361.
- Thompson, E.B.; Ayala-Torres, S. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1999, 34, 25.
- Kaul, D. *Mol. Cell Biochem.* 2001, 219, 65.
- Panini, S.R.; Sinensky M.S. *Curr. Opin. Lipidol.* 2001, 12, 529.
- Bjorkhem, I.; Diczfalussy, U. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002, 22, 734.
- Massey, J.B. *Curr. Opin. Lipidol.* 2006, 17, 296.
- Subbiah, M.T.; Abplanalp, W. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2003, 73, 19.
- Takei, T.; Yoshida, M.; Ohnishi-Kameyama, M.; Kobori, M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005, 69, 212.
- Hata, K.; Sugawara, F.; Ohisa, N., Takahashi, S.; Hori, K. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25, 1040.
- Adcox, C.; Boyd, L.; Oehrl, L.; Allen, J.; Fenner, G.J. *Agric. Food Chem.* 2001, 49, 2090.
- Maguire, L.; Konoplyannikov, M.; Ford, A.; Maguire, A.R.; O'Brien, N.M. *Br. J. Nutr.* 2003, 90, 767.
- Ryan, E.; Chopra, J.; McCarthy, F.; Maguire, A.R.; O'Brien, N.M. *Br. J. Nutr.* 2005, 94, 443.
- D'Auria, M.V.; Minale, L.; Ricco, R. *Chem. Rev.* 1993, 93, 1839.
- Mellado, G.G.; Zubia, E.; Ortega, M.J.; López-González, P.J. *Steroids* 2004, 69, 291.
- Sauleau, P.; Bourguet-Kondracki, M.-L. *Steroids* 2005, 70, 954.
- Min, B.S.; Gao, J.J.; Nakamura, N.; Hattori, M. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 2000, 48, 1026.
- Gao, J.J.; Min, B.S.; Ahn, E.M.; Nakamura, N.; Lee, H.K.; Hattori, M. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 2002, 50, 837.
- Misharin, A.Y.; Ivanov, V.S.; Mehtiev, A.R.; Morozevich, G.E.; Tkachev, Y.V.; Timofeev, V.P. *Steroids*, 2007, 72, 305.
- Misharin, A.Y.; Mehtiev, A.R.; Morozevich, G.E.; Tkachev, Y.V.; Timofeev, V.P. *Bioorgan. Med. Chem.*, 2008, 16, 1460.
- Mosmann, T. *J. Immunol. Meth.*, 1983, 65, 55.

21. Bielawski, K.; Wolczynski, S.; Bielawska A. *Biol. Pharm. Bull.* 2001., 24, 704
22. Bessede, G.; Miguet, C.; Gamber, P.; Neel, D.; Lizard, G. *FASEB J.* 2001, 15, 1927
23. Kizaki, M.; Matsushita, H.; Takayama, N.; Muto, A.; Ueno, H.; Awaya, N.; Kawai, Y.; Asou, H.; Kamada, N.; Ikeda, Y. *Blood* 1996, 88, 1824
24. Ogawa, R.; Streiff, M.B.; Bugayenko, A.; Kato G.J. *Blood* 2002, 99, 3390.
25. Morishita, M.; Iwasaki, Y.; Onishi, A.; Asai, M.; Mutsuga, N.; Yoshida, M.; Oiso, Y.; Inoue, K.; Murohara, T. *J. Mol. Endocrinol.* 2003, 31, 441.
26. Robe, P.A.; Nguyen-Khac, M.; Jolois, O.; Rogister, B.; Merville, M.-P.; Bours, V. *BMC Cancer* 2005, 5, 32.
27. Hall, M.C. *Mol. Cell. Biochem.* 2006, 293, 1.
28. Izzo, I.; De Riccardis, F.; Sodano, G. *J. Org. Chem.*, 1998. 63, 4438
29. Rogers, L.L.; Zeng, L.; McLaughlin, G.L. *J. Org. Chem.*, 1998. 63. 3781.

Д.А. Филимонов¹, Г.Н. Апрышко²

КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПОИСК НОВЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ПРИНЦИПА ЛОКАЛЬНОГО СООТВЕТСТВИЯ

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва

²ГУ Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Исходя из гипотезы об определяющем для молекулярного узнавания значении локальных взаимодействий, нами создана целостная система дескрипторов атомных окрестностей – многоуровневых (MNA), реакционных (RMNA), количественных (QNA), и алгоритмов прогноза – спектров биологической активности; метаболических профилей и сайтов биотрансформации органических соединений; функциональной специфичности ферментов. На основе использования эмпирических данных о проявляемых органическими соединениями видах биологической активности создана компьютерная система PASS. По структурной формуле органического соединения PASS прогнозирует более 3000 видов биологической активности со средней точностью около 95%. Использование прогноза PASS позволяет уже на ранних стадиях исследований отобрать из возможных веществ-кандидатов те, которые могут обладать желательными видами биологической активности и с малой вероятностью способны вызывать нежелательные побочные эффекты. Сопоставление результатов прогноза и экспериментального изучения противоопухолевой активности показало, что исключение из изучения веществ с отрицательным прогнозом приводит к 3-кратному снижению непроизводительных затрат на тестирование заведомо неактивных веществ. Работа выполнена при поддержке грантами РФФИ №№ 05-03-08077, 05-07-90123, INTAS # 03-55-5218, ISTC # 3197, FP6 LSHB-CT-2007-037590.

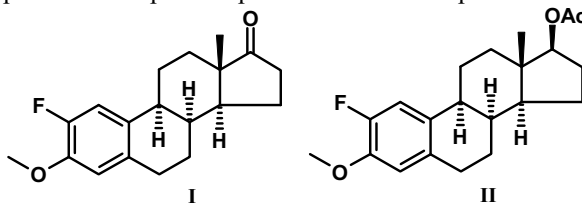
С.Н. Морозкина¹, Д.Б. Ушаков¹, Н.Д. Ещенко¹, С. Линдер², А.Г. Шавва¹

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА 8 α -АНАЛОГОВ СТЕРОИДНЫХ ЭСТРОГЕНОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФТОР В ПОЛОЖЕНИИ 2

¹Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет
²Онкологический центр Каролинска, Каролинский госпиталь, Стокгольм, Швеция,
e-mail AGShavva@yandex.ru, тел./факс: (812) 428-6809

Тамоксифен, специфический модулятор ядерных рецепторов эстрогенов, широко используется для лечения гормонзависимого рака молочной железы. Однако при длительном применении клетки опухоли становятся гормонрезистентными, хотя рецепторы эстрогенов в опухоли могут сохраняться. Резистентность опухоли к тамоксифену связана с изменением внутриклеточных сигнальных путей. Недавно обнаружили, что последующая терапия эстрадиолом возвращает клеткам чувствительность к тамоксифену. Представлялось важным найти аналоги эстрогенов с пониженной гормональной активностью, сохранившими способность индуцировать апоптоз, тем более, что клетки опухоли можно сенсibilизировать к действию эстрогенов.

Стероиды **I** и **II**, обладают пониженной эстрогенной активностью по сравнению с 17 α -этинилэстрадиолом (ЕЕ), сохраняя остеопротекторное и гипохолестеринемическое действие (Таблица).



Группа подопытных крыс Sprague Dawley	Изменение веса тела за время опыта, г	Вес матки, мг/100 г веса тела	Вес золы от бедренной кости / «влажный» вес бедренной кости	Плотность минеральных компонентов, г/см ²	Содержание холестерина в сыворотке крови, мг / дл
Ложнооперированные	31 $\pm$ 4*	147 $\pm$ 9*	0,442 $\pm$ 0,007*	0,247 $\pm$ 0,004*	63,7 $\pm$ 1,8
Овариэктомированные	68 $\pm$ 5	32 $\pm$ 2	0,403 $\pm$ 0,005	0,220 $\pm$ 0,003	92,4 $\pm$ 3,2
Овариэктомированные, получавшие ЕЕ	27 $\pm$ 4	149 $\pm$ 8*	0,437 $\pm$ 0,004*	0,241 $\pm$ 0,008*	43,0 $\pm$ 1,8*
Овариэктомированные, получавшие стероид I	19 $\pm$ 4*	110 $\pm$ 5*	0,447 $\pm$ 0,005*	0,242 $\pm$ 0,005*	36,0 $\pm$ 3,2*
Овариэктомированные, получавшие стероид II	16 $\pm$ 3*	109 $\pm$ 7*	0,449 $\pm$ 0,005*	0,252 $\pm$ 0,007*	29,7 $\pm$ 2,6*

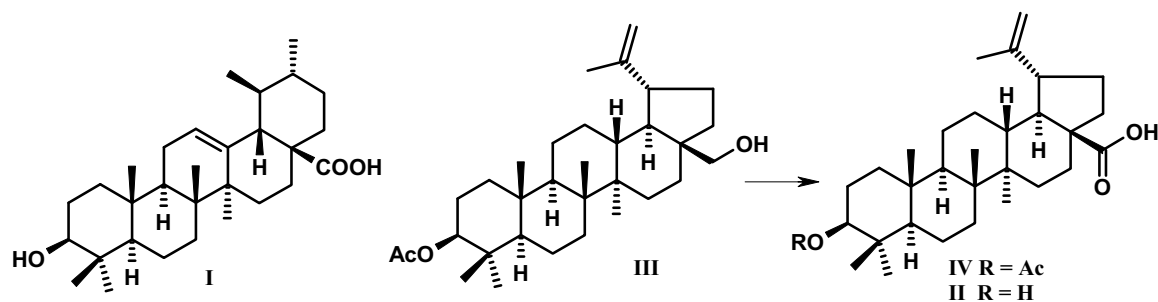
На основе этих соединений был получен индуктор апоптоза опухолевых клеток, не содержащих рецепторов эстрогенов.

С.Н. Морозкина¹, О.И. Антимонова¹, А.Г. Шавва²

НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА УРСОВОЙ И БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТ

¹Санкт-Петербургский государственный университет, химический факультет
²Онкологический центр Каролинска, Каролинский госпиталь, Стокгольм, Швеция

Показано, что введение овариэктомированным крысам линии Sprague-Dawley урсоловой или бетулиновой кислот не приводит к снижению содержания минеральных компонентов в бедренной кости.



Таблица

Результаты исследования некоторых биологических свойств урсоловой (I) и бетулиновой кислот (II)

Группа подопытных крыс	Изменение веса тела за время опыта, г	Утеротропная активность		Вес золы от бедренной кости / «Влажный» вес бедренной кости	Содержание холестерина в сыворотке крови, мг/100 мл
		Вес матки, мг / 100 г веса тела	Содержание рецепторов прогестерона, фмоль/мг белка		
Ложнооперированные	30,6±2,7*	156,7±8,9**	62±5**	0,440±0,006*	58,7±1,8*
Овариэктомированные	65,5±4,2	34,5±2,6	18±2	0,396±0,005	70,7±1,9
Овариэктомированные, получавшие ЕЕ,	9,0±4,1*	156,2±7,4**	102±11**	0,448±0,005*	27,2±1,5**
Овариэктомированные, получавшие урсоловую кислоту	62,5±4,1	32,4±3,5	20±2	0,407±0,005	46,3±2,2*
Овариэктомированные, получавшие бетулиновую кислоту	64,1±5,3	29,8±2,5	22±3	0,385±0,008	49,4±3,1*

* t-критерий Стьюдента $p < 0,05$;

** - $p < 0,01$.

Создание новых лекарственных препаратов для лечения онкологических гормонозависимых заболеваний, таких как рак молочной железы, рак эндометрия у женщин и рак предстательной железы у мужчин, продолжает оставаться актуальной задачей. Для её решения в настоящее время чаще всего используются антигормональные препараты и ингибиторы ферментов, ответственные за образование соответствующих гормонов [1,2].

Известно, что урсоловая (I) [3] и бетулиновая (II) [4,5] кислоты являются ингибиторами процессов ангиогенеза и могут усиливать апоптоз в клетках различных опухолей [6-10]. Кроме того, урсоловая кислота ингибирует образование ароматазы [11]. Это открывает перспективы применения указанных три-терпеноидов для лечения онкологических заболеваний, особенно в комбинации с известными противоопухолевыми препаратами. С другой стороны, бету-

линовая кислота проявляет противовоспалительную активность, частично опосредованную рецепторами глюкокортикоидов [12]. При длительном применении это может привести к увеличению риска возникновения остеопороза – основного побочного эффекта глюкокортикоидов [13].

И хотя нет серьезных экспериментальных доказательств влияния урсоловой кислоты на указанные рецепторы, представлялось важным исследовать действие тритерпеноидов (I) и (II) на содержание минеральных компонентов в кости.

Урсоловую кислоту выделяли из толокнянки, бетулиновую кислоту синтезировали из бетулина комбинацией известных методик. В опытах использовали тритерпеноиды со степенью чистоты не менее 98%, идентификацию модельных соединений проводили с применением масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C .

Влияние тритерпеноидов на минеральные компоненты кости изучали в опытах на овариэктомизированных крысах по методу Kalu [14], модифицированному на кафедре химии природных соединений СПбГУ [15]. Положительным контролем служил 17 α -этинилэстрадиол (ЕЕ) в дозе 0,1 мг/кг веса тела в сутки. Tritерпеноиды вводили *per os* в виде суспензии в оливковом масле в дозе 20 мг/кг веса тела в сутки в течение 35 суток.

Из результатов исследований, представленных в таблице, можно заключить, что урсоловая (I) и бетулиновая (II) кислоты не оказывают в условиях эксперимента негативного влияния на содержание минеральных компонентов в бедренной кости подопытных животных и не проявляют утеротропного действия. В то же время они нормализуют содержание холестерина в сыворотке крови. Под действием этих кислот,

в отличие от 17 α -этинилэстрадиола [15,16] происходит снижение триглицеридов в сыворотке крови (эти данные в таблице не представлены), что является дополнительным преимуществом урсоловой (I) и бетулиновой (II) кислот, поскольку гипертриглицеридемическая активность рассматривается как независимый фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний [17]. Полученные результаты о влиянии урсоловой кислоты (I) на липидный обмен подтверждают имеющиеся в литературе данные [18,19].

Недавно в опытах на мышах было показано, тритерпеноид милиацин снизил лимфотоксический эффект метотрексата, используемого в клинической онкологии [20]. Представленные нами данные также указывают на перспективность исследования противоопухолевого действия урсоловой (I) и бетулиновой (II) кислот, в первую очередь, при комбинированном действии этих кислот и уже применяющихся в клинике антигормональных и других препаратов.

Экспериментальная часть

Полноту протекания реакций проверяли методом ТСХ на пластинах Silufol в системах растворителей петролейный эфир – этилацетат, (4:1), (3:1). Детекти-

рование веществ проводили адсорбцией паров йода, в УФ-свете или под действием фосфомолибденовой кислоты. Для очистки веществ колоночной хроматографией использовали силикагель (0,040 – 0,063 мм) фирмы Merck.

Масс-спектры снимали на приборе MX-1321 при температуре в ионизационной камере 200–210°C и энергии ионизирующего излучения 70 eV.

Спектры ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР регистрировали при 295K на спектрометре Bruker DPX-300 соответственно на частотах 300.130 и 75.468 МГц при 295K. Спектры урсоловой и бетулиновой кислот сняты в DMSO- d_6 , остальных соединений в CDCl_3 . Для спектров ^1H -ЯМР использовали растворы 5–7 мг вещества в 0.6 мл растворителя, а для ^{13}C -ЯМР – 30–50 мг в том же объеме. Химические сдвиги измерены по отношению к тетраметилсилану.

Температуры плавления веществ определяли на нагревательном столике Boetius.

Урсоловая кислота (I). 1 кг сухих измельченных листьев толокнянки трижды экстрагировали 3 л этилового спирта в течение 2 суток, экстракты объединяли, спирт удаляли под вакуумом. К остатку добавляли 500 мл петролейного эфира (т. кип. 40–70 °C), смесь перемешивали при комнатной температуре 1 ч, после чего растворитель удаляли декантацией. Экстракцию окрашенных примесей петролейным эфиром повторяли ещё раз. Оставшуюся массу растворяли в 800 мл диэтилового эфира, добавляли 500 мл 3%-ного раствора едкого натра в воде. Темно-коричневый осадок, находящийся на границе раздела фаз, отфильтровывали, промывали водой и растворяли в 600 мл этанола. К полученному раствору добавляли, при сильном перемешивании, 10%-ный раствор соляной кислоты до pH 1. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали на фильтре водой до нейтральной реакции промывных вод, а затем сушили на воздухе. После кристаллизации осадка из смеси хлороформ-этанол получали 0,9–1,1 г урсоловой кислоты (I), т. пл. 283–284°C. По лит. данным т.пл. 283–283,5°C [21]. Соединение (I) плавилось без депрессии температуры плавления в пробе смешения с заведомо известным веществом [21].

Спектр ^{13}C -ЯМР (δ , м. д.): 39.2 (C1), 27.8 (C2), 77.7 (C3), 39.1 (C4), 55.6 (C5), 18.8 (C6), 33.5 (C7), 40.0 (C8), 47.9 (C9), 37.4 (C10), 23.6 (C11), 125.4 (C12), 139.0 (C13), 42.5 (C14), 28.3 (C15), 24.6 (C16), 47.7 (C17), 53.2 (C18), 39.5 (C-19), 39.3 (C20), 30.9 (C21), 37.3 (C22), 29.1 (C23), 16.1 (C24), 16.9 (C25), 17.8 (C26), 24.1 (C27), 179.1 (C28), 17.9 (C29), 24.1 (C30) (отнесение сигналов в соответствии с работой [21]).

Масс-спектр, m/z (I, %): 456 (2, M^+), 441 (1), 438 (1), 300 (2), 248 (100), 207 (29), 203 (34), 133 (31).

Найдено, %: C 78.68; H 10.64. $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$. Вычислено, %: C 78.90; H 10.59.

Бетулиновая кислота (II). 5 г известного 3-моноацетата бетулина (III) [23] окисляли хромовым ангидридом в условиях, предложенных для синтеза бетулоновой кислоты [24]. После обычной обработки получали 2,4–2,6 г ацетата бетулиновой кислоты (IV) с

т.пл. 287-290° С. По лит. данным, т.пл. 288-290° С [22]. 2 г полученного соединения гидролизovali в соответствии с методикой работы [22]. Выход бетулиновой кислоты (II) после кристаллизации из метанола составлял 1,5-1,6 г, т.пл. 293-295° С. По лит. данным, т.пл. 295-298°С [23], 300-302°С [24]. Спектр ЯМР ¹H соединения (II) соответствовал данным литературы [24].

Найдено, %: С 78.85; Н 10.69. С₃₀Н₄₈О₃. Вычислено, %: С 78.90; Н 10.59.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гершанович М.Л., Филов В.А., Акимов М.А., Акимов А.А. Введение в фармакологию злокачественных опухолей. 1999, С-Петербург, «СОТИС».
2. Chetrite G.S., Pasqualini J.R. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2001, 76, 95.
3. Cadrenas C., Quesada A.R., Medina M.A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 320, 402.
4. Pat. USA 6.228.850 (cl. 514-169; A61K31/15). – Chem. Abstr. 2001, 134. P336213b.
5. Mukherjee R., Jaggi M., Rajendran, Srivastava S.K., Siddiqui M.J.A., Vardhan A., Burman A.C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 3169.
6. Kim D.K., Baek J.H., Kang C.M., Yoo M.A., Sung J.W., Chung H.Y., Kim N.D., Choi Y.H., Lee S.H., Kim K.W. *Int. J. Cancer.* 2000, 87, 629.
7. Harmand P.O., Duval R., Liagre B., Jayat-Vignoles C., Beneytout J.L., Delage C., Simon A. *Int. J. Oncology.* 2003, 23, 105.
8. Pisha E., Chai H., Lee I.S., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W., Fong H.N., Kinghorn A.D., Brown D.M., Wani M.C., Wall M.E., Hieken T.J., Gupta T.D., Pezzuto J.M. *Nat. Med.* 1995, 1, 1046.
9. Cichewitz R.H., Kouzi A.A. *Med. Res. Rev.* 2004, 24, 90.
10. Wick W., Grimm C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999, 289, 1306.
11. Jeong H.-J., Chang L.C., Kim Ho-K., Kinghorn A.D., Pezzuto J.M. *Medicinal Chemistry and Natural Products.* 2000, 23, 243.
12. Recio R.C., Giner R.M., Manes S., Rios J.L. *Planta Med.* 1995, 61, 182.
13. Насонов Е.Л., Скрипникова И.А., Насонова В.А. Проблема остеопороза в ревматологии. М., Стин, 1997. 429 с.
14. Kalu D.N. *Bone Miner.* 1991, 15, 175.
15. Белов В.Н., Дудкин В.Ю., Урусова Е.А., Старова Г.Л., Селиванов С.И., Николаев С.В., Ещенко Н.Д., Морозкина С.Н., Шавва А.Г. *Биоорг. химия.* 2007, 33, 315.
16. Шавва А.Г., Морозкина С.Н., Ищенко И.В., Елисеев И.И., Селиванов С.И., Абусалимов Ш.Н., Селиванов С.С., Каменева И.Ю., Ещенко Н.Д. *Биоорг. хим.*, 2007, 33, 310.
17. Koren E., Corder C., Mueller G., Centurion H., Hallam G., Fesmire J., McGonathy W., Alaupovic P. *Atherosclerosis (Shannon, Irel)*, 1996, 122, 105.
18. Парфентьева Е.П. *Хим.-фарм. журн.*, 1979, 10.
19. Somova L.I., Shoda F.O., Ramnanan P., Nadar A. *J. Ethnopharmacol.*, 2003, 84, 299.
20. Железнова А.Д., Железнов Л.М., Штиль А.А., Фролов Б.А. *Бюлл. экп. биол. мед.*, 2007, 144, 458-463.
21. Шавва А.Г., Матюхина Л.Г., Салтыкова И.А. // *Химия природн. соед.*, 1969, 447.
22. Moghaddam F.M., Farimany M.M., Salahvarzi S., Amin G. *eCAM*, 2006, 1. doi: 10.1993/ecam/nel065.
23. Li T.-C., Wang J.-X., Zheng X.-J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1998, 3957.
24. Шон Б. Ле, Каплун А.П., Шпилевский А.А., Андия-Правдивый Ю.Э., Алексеева С.Г., Григорьев В.Б., Швец В.И. *Биоорг. хим.*, 1998, 24, 787.

А.В. Яголович, Д.А. Долгих, М.Э. Гаспарян

ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ И ОЧИСТКА МУТАНТНОГО ВАРИАНТА TRAIL-DR5 ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЦИТОКИНА TRAIL С ПОВЫШЕННОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ К РЕЦЕПТОРУ DR5/TRAIL-R2

Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Москва

TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) способен селективно вызывать апоптоз в раковых клетках, не затрагивая нормальные клетки (Wiley et al., 1995). Показано (Kelley et al., 2005), что в большинстве видов опухолей рецептор DR5/TRAIL-R2 играет наибольшую роль в проведении сигнала апоптоза при связывании с лигандом.

В 2005 году Келли и др. определили, что мутации Y189N, R191K, Q193R, H264R, I266L и D267Q в структуре белка TRAIL повышают селективность лиганда к рецептору DR5/TRAIL-R2. При этом снижается эффективность связывания с другими рецепторами. Мы внесли соответствующие мутации в нуклеотидную последовательность гена TRAIL и экспрессировали рекомбинантный слитный белок Trx/TRAIL-DR5 (с доменом тиоредоксина на N-конце в качестве «несущего» белка) в штамме *E.coli* BL21(DE3). Уровень экспрессии составил 1 г/л. Растворимость мутантного белка Trx/TRAIL-DR5 повышена в 3,5 раза по сравнению с Trx/TRAIL. В связи с этим мы производили очистку белка из растворимой фракции методом никель-аффинной хроматографии, после чего расщепили слитный белок Trx/DR5-TRAIL легкой цепью рекомбинантной человеческой энтеропептидазы. В результате был получен очищенный мутантный цитокин TRAIL-DR5 в количестве 200 мг с 1 л культуры клеток. Препарат TRAIL-DR5 на 98% состоит из тримерных молекул, как показано методом аналитического ультрацентрифугирования. Исследования на линиях раковых клеток HeLa и Jurkat подтвердили повышенную эффективность индукции апоптоза цитокином TRAIL-DR5 по сравнению с TRAIL дикого типа. Получение рецептор-специфичного варианта TRAIL-DR5 позволяет разработать индивидуальный подход к терапии конкретных типов опухолей.