

МОДУЛЬНЫЕ НАНОТРАНСПОРТЕРЫ ПРОТИВОРАКОВЫХ ЛЕКАРСТВ, ПРИДАЮЩИЕ ИМ КЛЕТОЧНУЮ СПЕЦИФИЧНОСТЬ И БОЛЬШУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

©2009 г.

А. С. СОБОЛЕВ

*Институт биологии гена РАН и Московский государственный
университет им. М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Адресная доставка фотосенсибилизаторов в ядра
раковых клеток-мишеней. III. Адресная доставка эмиттеров
альфа-частиц в ядра раковых клеток-мишеней. IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Прежде чем перейти к описанию и характеристикам модульных нанотранспортеров (МНТ), доставляющих лекарства в заданный компартмент клеток, желательно определить, какие именно лекарства целесообразно доставлять с их помощью. К ним можно отнести, по крайней мере, две группы лекарственных веществ. Первую группу составляют вещества, которые могут проявить свое действие, только оказавшись в определенном клеточном компартменте (например, ДНК – в ядре). Ко второй группе можно отнести противоопухолевые лекарства, способные осуществлять цитотоксическое действие, находясь в любом месте клетки, однако можно найти такой клеточный компартмент, который наиболее чувствителен к их действию. Его

Принятые сокращения: $^{211}\text{At-SAGMB}$ – *N*-сукцинимидил-3- ^{211}At астрато-4-гуанидинометилбензоат; DTox – эндосомолитический модуль на основе транслокационного домена дифтерийного токсина; HMP – гемоглобиноподобный белок *Escherichia coli*; MСГ – α -меланоцитстимулирующий гормон; МНТ – модульные нанотранспортеры; ПЯЛ – последовательность [аминокислотная] ядерной локализации; ФС – фотосенсибилизаторы; ЭАЧ – эмиттеры альфа-частиц; ЭФР – эпидермальный фактор роста.

Адрес для корреспонденции: sobolev@igb.ac.ru

Работа выполнена при поддержке грантов Нидерландской организации по научным исследованиям NWO (грант № 047.017.025), CRDF (грант № RUB-02-2663-МО-05) и Национальных институтов здоровья США NIH/NINDS (грант № NS20023).

можно определить как компартмент, локализация в котором требует минимальной дозы этого цитотоксического лекарства, с тем чтобы вызвать гибель клетки. Примерами этой группы могут служить фотосенсибилизаторы (ФС), используемые для фотодинамической терапии ряда болезней, особенно онкологических, и радионуклиды, испускающие частицы с коротким пробегом (например, эмиттеры альфа-частиц (ЭАЧ), используемые для эндорadiотерапии злокачественных новообразований, или эмиттеры электронов Оже*, планируемые для той же цели).

В отношении ФС известно, что: а) действующим цитотоксическим началом ФС являются активные формы кислорода (синглетный кислород, гидроксильный радикал и некоторые другие свободные радикалы); б) наиболее чувствительный компартмент клетки к поражающему действию активных форм кислорода – клеточное ядро; в) ФС локализуются в различных клеточных компартментах за исключением клеточного ядра; г) при системном введении ФС связываются с белками крови, которые, по-видимому, в большей мере определяют захват клетками ФС, чем их собственные физико-химические свойства; д) фотофизические свойства ФС, находящихся в комплексе с белками крови, могут отличаться от свойств свободных ФС. Обоснованиям этих положений посвящены опубликованные ранее обзоры, в т.ч. автора с его коллегами [1, 2]. В отношении ЭАЧ уже давно, более 50 лет известно, что наиболее чувствительным компартментом для альфа-частиц является клеточное ядро [3]. Что же касается радионуклидов, испускающих электроны Оже, то они практически неэффективны вне клеточного ядра [4]. Этот набор выводов приводит к мысли о целесообразности сведения к минимуму случайных взаимодействий ФС с компонентами крови и придания ФС и ЭАЧ способности проникать в клеточные ядра клеток-мишеней.

II. АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ В ЯДРА КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

Доставить ФС или ЭАЧ в ядро можно, создав специальные транспортеры с наперед заданными свойствами, которые обеспечивали бы «узнавание» клетки-мишени, поглощение ею транспортеров с ФС или ЭАЧ и последующее их проникновение в ядро. Для реализации такой задачи мы разработали модульные транспортеры (см. обзор

* Электронное излучение, возникающее при таком переходе атомов из возбужденного состояния в более низкое энергетическое состояние, который не сопровождается испусканием фотонов.

[1]), обладающие: 1) интернализуемым лигандным модулем, обеспечивающим «узнавание» клетки-мишени и последующий рецептор-опосредованный эндоцитоз транспортера внутрь неё; 2) эндосомоли- тическим модулем, позволяющим транспортеру выйти из эндосом; 3) модулю с последовательностью ядерной локализации (ПЯЛ), которой он взаимодействует с импортинами – цитозольными белками, обеспечивающими активное перемещение в ядро; 4) и модулем-носителем для присоединения доставляемого лекарственного вещества. Термины «модуль» и «модульный» здесь употреблены в их прямом значении, поскольку дизайн таких транспортеров должен предполагать возможность переключения транспортера на различные типы клеток-мишеней и даже различные субклеточные компартменты, что быстрее и технологичнее может быть достигнуто, если компоненты транспортера легко заменяемы/переставляемы. Необходимость нескольких компонентов – не менее 4-х, диктуется следующими соображениями. Во-первых, придать транспортеру клеточную специ- фичность можно одновременно со способностью проникать внутрь клетки-мишени, если иметь в его составе компонент, который с высо- кой специфичностью связывается с интернализуемыми, эндоцитируе- мыми рецепторами. Также важно, чтобы используемые рецепторы были сверх-экспрессированы на клетках-мишенях и слабо представ- лены (в идеальном случае – отсутствовали) на расположенных поблизости нормальных клетках. Во-вторых, добиться специфичной внутриядерной доставки можно, если в транспортере есть ПЯЛ. В-третьих, упомянутые выше импортины – цитозольные белки, тогда как транспортер, попавший внутрь клетки путем рецептор-опосредо- ванного эндоцитоза, заключен в эндоцитозные пузырьки (эндосомы и др.) и поэтому отделен от импортинов. Это означает, что транспортер не может с ними взаимодействовать и что ему необходимо придать еще один компонент, который обеспечил бы выход транспортера из эндоцитозных пузырьков. В-четвертых, все компоненты, или модули, нужно объединить в единое целое – транспортер – и иметь возможность присоединять к нему переносимые лекарственные вещества; данной цели служит модуль-носитель.

Сначала мы попытались доказать принципиальную возможность решения поставленной задачи, используя полипептидные конъюгаты, содержащие вышеперечисленные модули и созданные путем соеди- нения модулей бифункциональными кросс-сшивающими реаген- тами (подробнее см. [5–9]). Оказалось, что эти молекулярные конст- рукции, обладающие заданным набором модулей, действительно обеспечивали специфичную доставку ФС в клетки-мишени, интер-

нализацию в них, выход из внутриклеточных везикул и доставку в ядро. Индивидуальные модули в составе конструкций сохраняли свои функции и служили главной задаче – достижению высокой эффективности и клеточной специфичности ФС. Отметим, что интернализированный ФС был более цитотоксичным, чем тот же ФС, локализованный на клеточной поверхности [10–12], тогда как этот же ФС, попавший с помощью конструкции в ядро, оказывался более эффективным, чем интернализированный [5, 6]; свободный ФС был наименее эффективным в фотодинамическом поражении клеток. Таким образом, был подтвержден вывод о том, что клеточное ядро является гиперчувствительным к фотодинамическому действию ФС.

Важно иметь в виду, насколько технологически реализуемы те или иные транспортные конструкции; многокомпонентные транспортеры, полученные путем соединения кросс-сшивающими реагентами (см. выше), вряд ли смогли бы найти широкое применение, поскольку их производство трудоемко и дорого. Но эти транспортеры, созданные нами на первом этапе, впрочем, и не претендовали на возможное практическое применение: их задачей была проверка правильности подхода как такового. Для целей же возможного практического применения нами были созданы рекомбинантные модульные нанотранспортеры (МНТ; схему их строения и этапов проникновения в клетку см. на рис. 1), содержащие: 1) α -меланоцитостимулирующий гормон (МСГ) или эпидермальный фактор роста (ЭФР) в качестве интернализуемых лигандных модулей, связывающихся с меланокортиновыми-1 рецепторами, сверх-экспрессированными на клетках меланомы человека и мышей, или рецепторами ErbB1, сверх-экспрессированными на клетках рака головы и шеи, рака пищевода, мочевого пузыря и ряда др.; 2) оптимизированную ПЯЛ большого Т-антигена вируса SV40; 3) гемоглобиноподобный белок НМР *Escherichia coli* в качестве модуля-носителя и 4) транслокационный домен дифтерийного токсина в качестве эндосомолитического модуля (DTox) [13–15]. МНТ были получены с чистотой 90–98%. Позже были созданы МНТ с другими лигандными модулями: интерлейкином-3 (мишени этого МНТ – клетки острого миелоидного лейкоза со сверх-экспрессией рецепторов к интерлейкину-3) и соматостатином (для клеток нейробластомы со сверх-экспрессией соматостатиновых рецепторов) [16].

Следующим необходимым этапом стала проверка, насколько входящие в состав МНТ модули сохранили свои функции, необходимые для достижения основной цели – специфической внутриклеточной доставки лекарственного вещества в клетки-мишени.



Рис. 1. Схема строения модульного нанотранспортера (МНТ) и этапов его проникновения в клетку-мишень.

Первый модуль МНТ – лигандный – осуществляет двойную функцию: специфическое «узнавание» раковой клетки-мишени и проникновение в эту клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Второй, эндосомолитический модуль позволяет МНТ «сойти» с эндоцитозного пути до попадания в лизосомы, чтобы дать возможность нанотранспортеру взаимодействовать с импортинами. Для этой цели в качестве 2-го модуля используется полипептидный фрагмент, способный делать дефекты в мембранах при рН эндосом. Доставка в клеточное ядро обеспечивается 3-м модулем, содержащим аминокислотную последовательность ядерной локализации, «узнаваемую» импортинами, находящимися в бесструктурной части цитоплазмы. Четвертый модуль МНТ – модуль-носитель служит для присоединения транспортируемого лекарства.

Характеристику функциональности ЭФР-содержащих МНТ оценивали [15] по связыванию рецепторами ЭФР на клетках эпидермоидной карциномы человека А431, сверх-экспрессирующей эти рецепторы [17], а у МСГ-содержащих МНТ эту оценку осуществляли [13] на клетках мышинной меланомы В16-F1 со сверх-экспрессией меланокортиновых-1 рецепторов. Константы диссоциации (K_d) для комплексов таких МНТ, как НМР-ПЯЛ-DТох-ЭФР и DТох-НМР-ПЯЛ-ЭФР с рецепторами ЭФР (рис. 2), составили 40 и 29 нМ, соответственно, что оказалось близким к K_d для ^{125}I -ЭФР. У МСГ, 13-членного олигопептида, несколько снизилось сродство к меланокортиновым рецепторам, когда он вошел в состав МСГ-содержащих МНТ (до примерно $2 \cdot 10^{-8}$ М) [13].

Судьба МНТ, связавшихся с интернализуемыми рецепторами, предопределяется процессами рецептор-опосредуемого эндоцитоза: в частности, МНТ должен оказаться в эндосомах – замкнутых мембранных пузырьках с постепенным закисляющимся содержимым, которые он должен активно покинуть, чтобы перейти в цитозоль, где локализованы импортины, способные, связавшись с ПЯЛ, обеспечить доставку МНТ в ядро. Выход из эндосом должен осуществить эндосомолитический модуль, DТох, задача которого – создание дефектов в мембранах со стороны, имеющей слабокислую среду (как внутри у эндосом).

Одним из методов оценки способности полипептида делать поры в мембранах является измерение выхода красителя из липосом, нагруженных им [18]. Исследуемые МНТ вызывали выход красителя в двух диапазонах рН. Первый приходился на интервал между рН 5,5 и 6,5, который близок к рН эндосом и обусловлен модулем DТох [13, 15], т.к. он сам в этом интервале делал поры [13]. Второй был выявлен в более кислой области с максимумом рН от 3 до 4 и его оказалось возможным приписать действию НМР.

Дефекты в мембранах, создаваемые МНТ и обнаруженные в опытах на липосомах, были охарактеризованы электрохимически и с помощью атомно-силовой микроскопии [15, 19, 20]. Изучение проводимости плоского липидного бислоя после добавления МНТ при рН 5,5 позволило выявить возникновение ионных каналов с проводимостью около 2–5 нСм, тогда как МНТ без эндосомолитического модуля подобным эффектом не обладал. Не возникали каналы и при действии полноразмерного МНТ при нейтральном рН=7,0. Через 5–15 мин после закисления среды до рН 5,5 в липидном бислое (яичный лецитин) в присутствии МНТ (рис. 3) с помощью атомно-силовой микроскопии выявляются кольцевые структуры диаметром 30–50 нм. Через 40–60 мин можно было обнаружить флуктуирующие отверстия

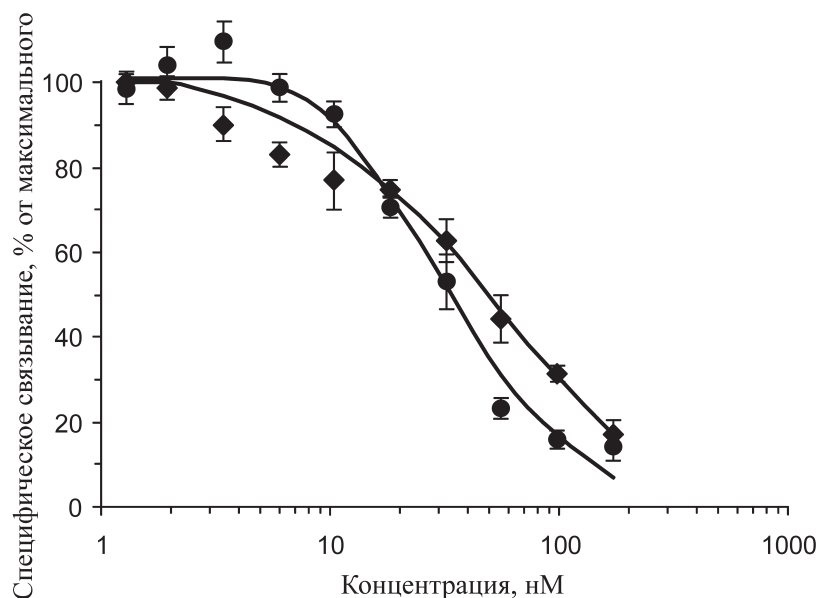


Рис. 2. Конкуренция двух МНТ – DTox-НМР-ПЯЛ-ЭФР (●) и НМР-ПЯЛ-DTox-ЭФР (◆) – с ^{125}I -DTox-НМР-ЭФР (20 нМ) за связывание с рецепторами ErbB1 на клетках эпидермоидной карциномы человека A431 [15]. Меченый усеченный вариант МНТ, ^{125}I -DTox-НМР-ЭФР, имеет $K_d = 110$ нМ и $t_{3,1} \cdot 10^6$ мест специфического связывания в расчете на 1 клетку A431.

диаметром 50–200 нм и глубиной, равной толщине бислоя. При $\text{pH} = 7,0$ таких изменений обнаружено не было. Удалось показать, что возникновение флуктуирующих пор обусловлено действием двух мембраноактивных доменов DTox и НМР. Диаметр этих пор (50–200 нм) существенно превышает размеры МНТ, благодаря чему не связавшиеся с бислоем молекулы МНТ могут, по-видимому, выходить из эндосом и достигать места своего назначения. Интересно отметить, что эндосомолитический модуль DTox, включенный в различные участки МНТ, вызывал, тем не менее, образование одинаковых дефектов в липидных мембранах [15], что позволяет предположить его способность функционировать, находясь в различных полипептидных контекстах; это предположение согласуется с результатами Низара и др. [21].

С помощью биоспецифической атомно-силовой микроскопии было обнаружено, что наблюдаемые на бислое возвышенности, которые образуют кольцевые структуры и часто видны рядом с флуктуирующими порами, образованы молекулами МНТ. Биоспеци-

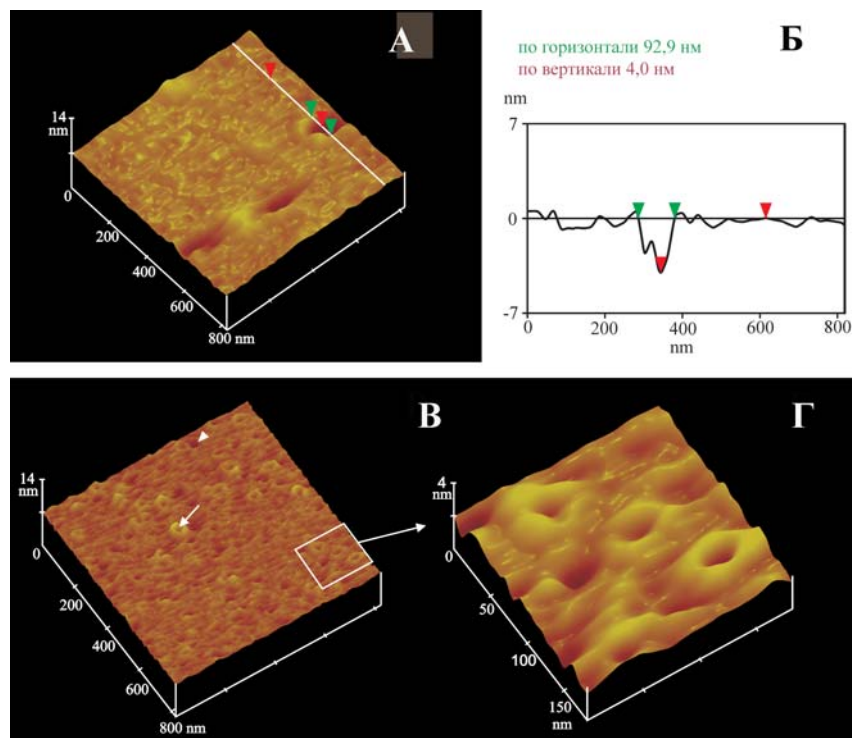


Рис. 3. Атомно-силовая микроскопия дефектов в липидных бислоях под действием МНТ DТох-НМР-ПЯЛ-ЭФР при рН 5,5 [15].

А – изображение крупных отверстий и их сечение (Б) перпендикулярной плоскостью вдоль белой линии с характеристиками ширины (между зелеными значками) и глубины (между красными значками); В – мелкие дефекты и их увеличенное изображение (Г). Один из мелких дефектов, окруженный валиком, указан белой стрелкой; одно из крупных флуктуирующих отверстий обозначено белым значком.

фичность (к МНТ) зонда кантилевера атомно-силового микроскопа была достигнута путем его модификации аффинно очищенными кроличьими антителами к МНТ. С помощью такого зонда были получены кривые зависимости силы взаимодействия зонда с липидным бислоем и с МНТ на липидном бислое от расстояния между зондом и этими объектами. Оказалось, что средняя сила специфического взаимодействия МНТ-антитело составляет 192 ± 23 пН, что характерно для специфических взаимодействий антиген-антитело [22].

Известно, что при сканировании зондом, модифицированным антителами (или антигеном), на подложке в режиме прерывистого контакта из-за взаимодействий антиген-антитело наблюдается увеличение кажущейся высоты сканируемых объектов на 1–2 нм [23]. При сканировании немодифицированным зондом лецитиновых бислоев, содержащих МНТ, при рН 5,5 было выявлено три типа частиц: со средними высотами 1,1, 2,2 и 4,4 нм. Три типа частиц наблюдаются и при сканировании в режиме прерывистого контакта зондом, модифицированным антителами к МНТ. Но при этом их кажущиеся высоты достоверно больше на 1–2 нм: 2,0 ($p < 0,001$), 4,3 ($p < 0,05$) и 7 нм. Следовательно, все эти частицы образованы молекулами МНТ и, судя по их средней высоте, представляют собой молекулы МНТ, встроенные в бислои, адсорбированные на поверхности бислоя и образующие агрегаты на поверхности бислоя. Таким образом, полноразмерные МНТ, т.е. МНТ, содержащие все четыре модуля, включая эндосомолитический модуль DТох, могут при закислении среды до рН 5,5 образовывать в бислоях поры, окаймленные МНТ, и с размерами, достаточными для выхода МНТ через них.

Наконец, функциональность эндосомолитического модуля была подтверждена на клеточном уровне. Измерение рН внутриклеточного микроокружения МНТ методом видеомикроскопии отношения изображений [13] было использовано, чтобы выявить способность МНТ с модулем DТох в своем составе выходить из закисляемых эндочитозных компартментов. В опытах на живых клетках меланомы мышей Клаудмана S91 (клон М3) усеченный вариант МНТ без эндосомолитического модуля выявлялся в везикулах со слабощелочным и кислым содержанием, тогда как полноразмерный МНТ (с модулем DТох) находился в нейтральном микроокружении.

С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса было охарактеризовано взаимодействие ПЯЛ, находящегося в составе МНТ, с димером α/β -импортинов [15]: константы сродства исследованных МНТ к импортинному димеру оказались очень близки к константе свободного полипептида с этим же ПЯЛ [24], что дает основания [25] считать этот модуль полностью функциональным.

Внутриклеточная локализация полноразмерных МНТ оказалась почти исключительно внутриядерной [13, 15] (на рис. 4 в качестве примера приведена локализация DТох-НМР-ПЯЛ-ЭРФ в клетках эпидермоидной карциномы человека А431).

Наконец, ковалентное присоединение ФС (бактериохлорина *p*) к МНТ через спейсер 1,5-диаминопентан не повлияло на продукцию этим ФС активных форм кислорода, что удалось показать, используя

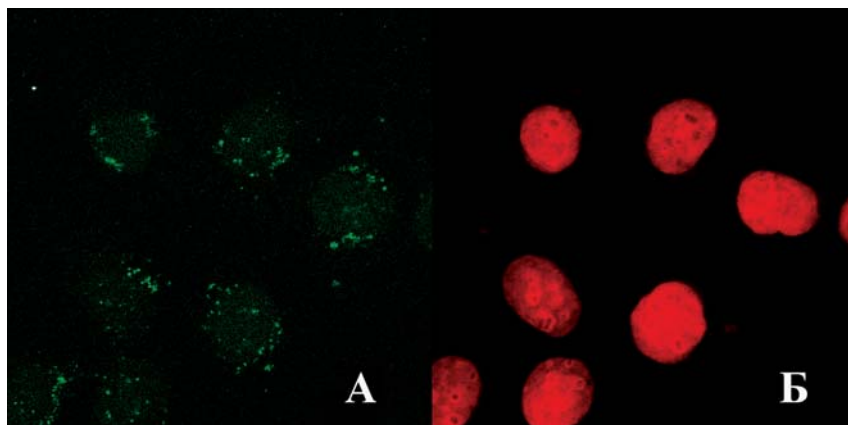


Рис. 4. Внутриклеточная локализация DTox-NMP-ПЯЛ-ЭФР в клетках эпидермоидной карциномы человека A431 [15].

А – иммуноцитохимическое выявление DTox-NMP-ПЯЛ-ЭФР, Б – та же группа клеток, что и на А, ДНК которых окрашена интеркалирующим красителем ToPro-3.

спиновые ловушки для гидроксильных радикалов и синглетного кислорода [15].

Таким образом, все модули в составе МНТ сохранили заложенные в них функции, что позволило достичь основной цели – доставки МНТ в ядро клетки-мишени. Кроме того, лекарственное вещество, ФС, ковалентно присоединенное к МНТ, не утратило способность генерировать действующее начало цитотоксических средств всего этого типа лекарств – активные формы кислорода.

Полная функциональность модулей в составе МНТ дала основание использовать МНТ для внутриядерной и специфической для заданного типа клеток доставки противоопухолевых лекарств. В опытах [15] на клетках эпидермоидной карциномы человека A431, сверх-экспрессирующей рецепторы ErbB1, выявилось резкое, более чем в 1000–3000 раз, усиление цитотоксического действия ФС хлорина e_6 и бактериохлорина p , доставляемых МНТ в ядра клеток, по сравнению с эффектом свободных ФС (рис. 5); оценка была сделана по соотношению EC_{50} , т.е. концентраций ФС, обеспечивающих полумаксимальный эффект. Более того, МНТ придавал ФС клеточную специфичность: хлорин e_6 практически в одинаковой степени поражал как клетки-мишени (A431), так и «не-мишеные» клетки, экспрессирующие малое число рецепторов ErbB1 (клетки NIH 3T3), тогда как в комплексе с МНТ этот ФС был неэффективен для клеток

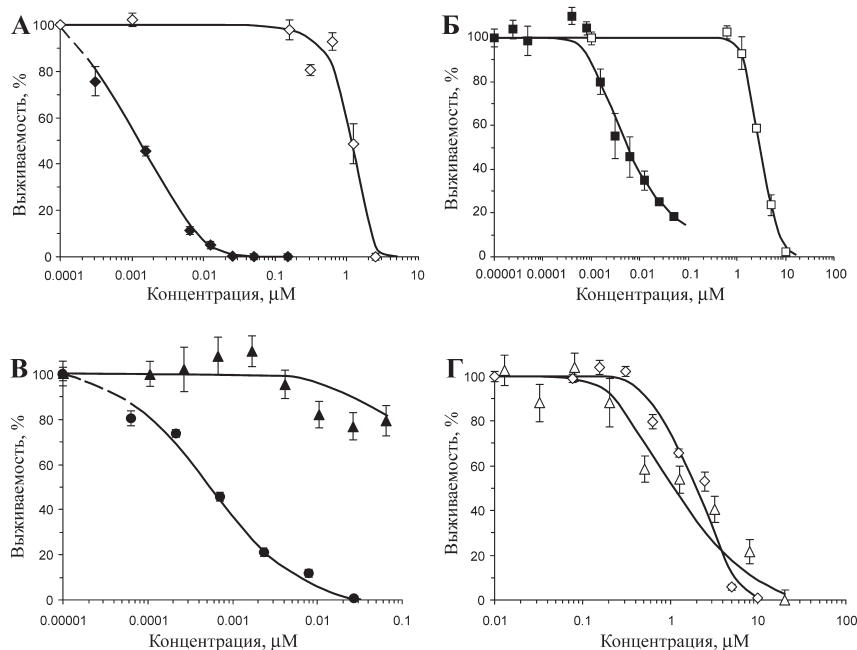


Рис. 5. Фотоситотоксичность и клеточная специфичность фотосенсибилизаторов, транспортируемых МНТ, по сравнению со свободными фотосенсибилизаторами [15].

А – (хлорин e_6)-НМР-ПЯЛ-ДТох-ЭФ (◆) и свободный хлорин e_6 (◇); Б – (бактериохлорин р)-НМР-ПЯЛ-ДТох-ЭФР (■) и свободный бактериохлорин р (□); В – (хлорин e_6)-ДТох-НМР-ПЯЛ-ЭФР на клетках-мишенях А431 (●) и на «не-мишенных» клетках НИН 3Т3 (▲); Г – свободный хлорин e_6 на клетках-мишенях А431 (◇) и «не-мишенных» клетках НИН 3Т3 (Δ). Среднее ± стандартная ошибка.

НИН 3Т3 в диапазоне концентраций, убивающих клетки-мишени А431 (рис. 5). Аналогичные результаты [13] были получены с использованием МСГ-содержащих МНТ на клетках мышинной меланомы В16-F1, сверх-экспрессирующих рецепторы к МСГ [26–29]. Цитотоксическое действие ФС бактериохлорина р в комплексе с МНТ, (бактериохлорин р)-ДТох-НМР-ПЯЛ-МСГ, характеризовалось $EC_{50} = 22$ нМ, тогда как у свободного бактериохлорина р $EC_{50} = 4990$ нМ, в 230 раз больше. (Бактериохлорин р)-ДТох-НМР-ПЯЛ-МСГ не был токсичен для нормальных мышинных фибробластов СЗН/10Т1/2 и НИН/3Т3, не сверх-экспрессирующих меланокортиновые-1 рецепторы. Возможную причину отличий в эффективности ЭФР- и МСГ-со-

державших МНТ, мы полагаем, следует искать в различном числе сверх-экспрессируемых рецепторов на клетках: $\sim 10^4$ на 1 клетку меланомы В16-F1 и $>10^6$ на 1 клетку эпидермоидной карциномы А431. Усеченный вариант МНТ, (бактериохлорин р)-НМР-ПЯЛ-МСГ, лишенный эндосомолитического модуля, был в 5,3 раза менее активным, чем полноразмерный МНТ, а МНТ без модуля с ПЯЛ оказался еще менее цитотоксичным. Из сопоставления эффективности полноразмерного МНТ с его усеченными вариантами, лишенными какого-либо из модулей, можно сделать вывод о том, что для проявления его максимальной эффективности необходимо наличие у МНТ всех модулей.

Эксперименты *in vivo* [15] были проведены на мышинной модели меланомы кожи – опухоли, неоптимальной для фотодинамической терапии, так как она почти полностью поглощает свет из-за очень интенсивной меланиновой пигментации. Однако, значительный эффект МНТ, полученный в опытах с бактериохлорином *p* на клетках меланомы *in vitro*, а также спектральные особенности этого ФС (максимум поглощения при 761 нм, т.е. в области более глубокого проникновения света в ткани, чем у большинства ФС) были аргументами в пользу постановки таких опытов. МСГ-содержащий МНТ, введенный внутривенно мышам C57/black с сингенной меланомой В16-F1 (инокулированной подкожно) уже через 3 часа начинал накапливаться в клетках опухоли и их ядрах. Бактериохлорин *p* сам по себе был неспособен повлиять ни на скорость роста опухоли, ни на среднюю продолжительность жизни мышей с меланомой, тогда как те же дозы этого ФС, вводимые по такой же схеме, но транспортируемые МНТ, достоверно ингибировали рост опухолей и увеличивали среднюю продолжительность жизни мышей-опухоленосителей.

III. АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА ЭМИТТЕРОВ АЛЬФА-ЧАСТИЦ В ЯДРА КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

Результаты с ФС указывают на перспективность использования нанотранспортеров для доставки других лекарственных веществ, например, радионуклидов, испускающих альфа-частицы. В первых опытах с ЭАЧ нами [30] были использованы модульные полипептидные конъюгаты, полученные путем соединения модулей бифункциональными кросс-сшивающими реагентами (об использовании их для доставки ФС см. выше); они продемонстрировали ожидаемую эффективность: доза радиоактивности, необходимая для поражения

63% клеток (A_0) за счет доставки альфа-эмиттера ^{211}At в ядра клеток гепатомы человека PLC/PRF/5 снизилась на порядок.

Недавно [31, 32] мы применили рекомбинантный МНТ (DTox-НМР-ПЯЛ-ЭФР), меченный ^{211}At с использованием *N*-сукцинимидил-3- ^{211}At ааста-4-гуанидинометилбензоата (^{211}At -SAGMB) [33], для направленного поражения раковых клеток со сверх-экспрессией рецептора ErbB1: эпидермоидной карциномы человека A431 и 2-х линий глиобластомы человека D247 MG и U87MG.wtEGFR. Предварительно было установлено, что мечение МНТ не меняет его свойств. Опыты по определению выживаемости клеток (клоногенная способность) отчетливо продемонстрировали более выраженную цитотоксичность ^{211}At -SAGMB-МНТ по сравнению со свободным ^{211}At на всех трех линиях раковых клеток. Для клеток глиобластомы D247 MG (рис. 6) величины A_0 для ^{211}At -SAGMB-МНТ и свободного ^{211}At были равны 3,8 и 69 кБк/мл, соответственно. Иными словами, доставка ^{211}At в ядра клеток-мишеней увеличивала его цитотоксичность в 18,2 раза. Для двух других линий, A431 и U87MG.wtEGFR, увеличение цитотоксичности составило 14,5 и 8,3 раза, соответственно. Продолжительная инкубация клеток глиобластомы D247 MG с ^{211}At -SAGMB-МНТ или свободным ^{211}At (контроль), когда распалось около 90% радионуклида, сравнение полученных величин A_0 и последующие количественные расчеты позволили предположить участие ядер отдачи, образующихся при альфа-распаде ^{211}At , в эффекте ^{211}At -SAGMB-МНТ [32].

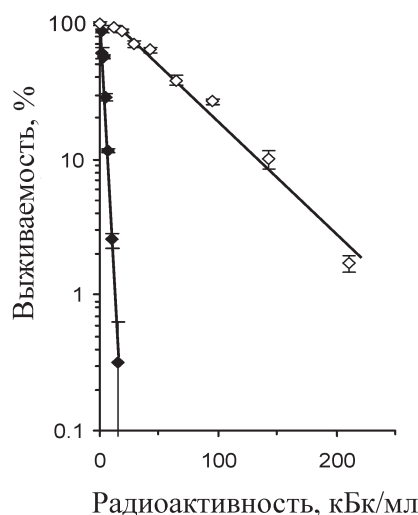


Рис. 6. Выживаемость (оценка по колониеобразованию) клеток глиобластомы D247 MG при различной добавленной к ним радиоактивности астага-211 в виде ^{211}At -SAGMB-МНТ (сплошные значки) или свободного ^{211}At -астагида (полые значки); по [32].

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные нами модульные МНТ позволяют придать клеточную специфичность и высокую эффективность ряду противоопухолевых лекарственных веществ благодаря тому, что были созданы из модулей с заданными свойствами, которые обеспечивали «узнавание» нужной клетки-мишени и последующий направленный транспорт в клеточное ядро. Модули МНТ, представляющие собой либо фрагменты различных природных полипептидов (ПЯЛ-содержащий и эндосомолитический модули), либо исходно целые молекулы (лигандные модули, модуль-носитель), функциональны в составе единой химерной, искусственной молекулы МНТ. «Узнавание» транспортерами клеток-мишеней наряду с проникновением внутрь их достигается благодаря лигандному модулю МНТ, способному связываться с высоким сродством со сверх-экспрессированными на клетках-мишенях (но не на окружающих «не-мишенных» клетках) интернализуемыми рецепторами. Высокоспецифичное связывание лиганда с рецептором обеспечивает, таким образом, клеточную специфичность, а также последующий рецептор-опосредованный эндоцитоз МНТ. Выход МНТ из эндосом, необходимый для того чтобы МНТ не подвергся деградации в лизосомах и, в конечном итоге, попал в ядро, осуществляет эндосомолитический модуль. Специфическая внутриклеточная доставка осуществляется благодаря наличию у МНТ модуля с соответствующей аминокислотной последовательностью, в случае доставки в ядро – с ПЯЛ. Наконец, модуль-носитель обеспечивает объединение модулей МНТ и присоединение доставляемого лекарственного вещества. Модульный принцип построения МНТ позволяет осуществлять замену модулей или изменение их положения в составе МНТ при изменении задачи: смены типа клеток-мишеней, смены целевого внутриклеточного компартмента и т. д. По нашему мнению, описанные здесь МНТ можно рассматривать как новые фармакологические агенты широкого применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Sobolev, A.S., Jans, D.A., Rosenkranz, A.A. (2000) *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **73**, 51–90.
2. Castano, A.P., Demidova, T.N., Hamblin, M.R. (2004) *Photodiagnosis Photodynam. Ther.*, **1**, 279–293.
3. Hall, E.J. (1994) *Radiobiology for the Radiologist*. 4th edition. Philadelphia: J.B. Lippincott. 376 p.
4. Boswell, C.A., Brechbiel, M.W. (2005) *J. Nucl. Med.*, **46**, 1946–1947.
5. Akhlynina, T.V., Jans, D.A., Rosenkranz, A.A., Statsyuk, N.V., Balashova, I.Y., Toth, G., Pavo, I., Rubin, A.B., Sobolev A.S. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 20328–20331.
6. Akhlynina, T.V., Jans, D.A., Statsyuk, N.V., Balashova, I.Y., Toth, G., Pavo, I., Rosenkranz, A.A., Naroditsky, B.S., Sobolev, A.S. (1999) *Int. J. Cancer*, **81**:734–740.
7. Chopp, M., Dereski, M.O., Madigan, L., Jiang, F., Logie, B. (1996) *Radiat. Res.*, **146**, 461–465.
8. Rosenkranz, A.A., Jans, D.A., Sobolev, A.S. (2000) *Immunol. Cell Biol.*, **78**, 452–464. e
9. Sobolev, A.S., Akhlynina, T.V., Rosenkrantz, A.A., Jans, D.A. (2002) US Patent #6,500,800.
10. Ахлынина Т.В., Гулак П.В., Серебрякова Н.В., Розенкранц А.А., Соболев А.С. (1990) *Бюлл. Экспер. Биол. Мед.* **109**, 150–152.
11. Akhlynina, T.V., Rosenkranz, A.A., Jans, D.A., Gulak, P.V., Serebryakova, N.V., Sobolev A.S. (1993) *Photochem. Photobiol.*, **58**, 45–48.
12. Hamblin, M.R., Miller, J.L., Ortel, B. (2000) *Photochem. Photobiol.*, **72**, 533–540.
13. Rosenkranz, A.A., Lunin, V.G., Gulak, P.V., Sergienko, O.V., Shumiantseva, M.A., Voronina, O.L., Gilyazova, D.G., John, A.P., Kofner A.A., Mironov, A.F., Jans, D.A., Sobolev, A.S. (2003) *FASEB J.*, **17**, 1121–1123.
14. Розенкранц А.А., Лунин В.Г., Сергиенко О.В., Гилязова Д.Г., Воронина О.Л., Янс Д.Э., Кюфнер А.А., Шумянцева М.А., Миронов А.Ф., Соболев А.С. (2003) *Генетика*, **39**, 259–268.
15. Gilyazova, D.G., Rosenkranz, A.A., Gulak, P.V., Lunin, V.G., Sergienko, O.V., Khrantsov, Y.V., Timofeyev, K.N., Grin, M.A., Mironov, A.F., Rubin, A.B., Georgiev, G.P., Sobolev, A.S. (2006) *Cancer Res.*, **61**, 10534–10540.
16. Sobolev A.S. (2008) *BioEssays*, **30**, 278–287.
17. Lokeshwar, V.B., Huang, S.S., Huang, J.S. (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 19318–19326.
18. Nir, S., Nieva, J.L. (2000) *Progr. Lipid Res.*, **39**, 181–206.
19. Khrantsov, Y.V., Rokitskaya, T.I., Rosenkranz, A.A., Gnuchev, N.V., Antonenko, Y.N., Sobolev, A.S. (2008) *J. Contr. Release*. **128**, 241–247.
20. Розенкранц А.А., Храмов Ю.В., Трусов Г.А., Гнучев Н.В., Соболев А.С. (2008) Доклады АН (биохимия, биофизика, молекулярная биология). **421**, 835–837.
21. Nizard, P., Chenal, A., Beaumelle, B., Fourcade, A., Gillet, D. (2001) *Protein Eng.*, **14**, 439–446.
22. Hinterdorfer, P., Baumgartner, W., Gruber, H.J., Schilcher, K., Schilcher, H. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3477–3481.
23. Raab, A., Han, W., Badt, D., Smith-Gill, S.J., Lindsay, S.M., Schindler, H., Hinterdorfer, P. (1999) *Nat. Biotechnol.* **17**, 901–905.
24. Catimel, B., Teh, T., Fontes, M.R., Jennings, I.G., Jans, D.A., Howlett, G.J., Nice, E.C., Kobe, B. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 34189–34198.
25. Hodel, M.R., Corbett, A.H., Hodel, A.E. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 1317–1325.

26. Jiang, J., Sharma, S.D., Fink, J.L., Hadley, M.E., Hruby, V.J. (1996) *Exp. Dermatol.*, **5**, 325–333.
27. Funasaka, Y., Sato, H., Chakraborty, A.K., Ohashi, A., Chrousos, G.P., Ichihashi, M. (1999) *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 105–109.
28. Wikberg, J.E., Muceniece, R., Mandrika, I., Prusis, P., Lindblom, J., Post, C., Skottner, A. (2000) *Pharmacol. Res.*, **42**, 393–420.
29. Salazar-Onfray, F., Lopez, M., Lundqvist, A., Aguirre, A., Escobar, A., Serrano, A., Korenblit, C., Petersson, M., Chhajlani, V., Larsson, O., Kiessling, R. (2002) *Br. J. Cancer.*, **87**, 414–422.
30. Розенкранц А.А., Хабатников П.А., Алиев Р.А., Янс Д.Э., Соболев А.С. (2002) *Молекулярная медицина*, **2**, 47–55.
31. Rosenkranz, A., Vaidyanathan, G., Pozzi, O., Lunin, V., Khramtsov, Y., Zalutsky, M., Sobolev, A. (2007) *J. Nucl. Med.*, **48**, 80P.
32. Rosenkranz, A.A., Vaidyanathan, G., Pozzi, O.R., Lunin, V.G., Zalutsky, M.R., Sobolev, A.S. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 2008, **72**, 193–200.
33. Vaidyanathan, G., Affleck, D.J., Bigner, D.D., Zalutsky, M.R. (2003) *Nucl. Med. Biol.*, **30**, 351–359.