

© А. Н. Тевяшова

А. Н. Тевяшова

КОНЬЮГАТЫ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ С МАКРОМОЛЕКУЛАМИ

ФГБУ "Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г. Ф. Гаузе" РАМН, 119021, Москва, ул. Б. Пироговская, д. 11, E-mail: chulis@mail.ru

В обзоре рассмотрены достижения последних лет в области создания конъюгатов на основе антрациклиновых антибиотиков и макромолекул. Конъюгаты классифицированы в зависимости от размера макромолекулы и наличия или отсутствия в ней структурного элемента, отвечающего за селективное связывание (взаимодействие) с определенными структурами клеточной мембраны или цитоплазмы.

Ключевые слова: антрациклиновые антибиотики; доксорубицин; даунорубицин; макромолекулы; конъюгаты; антипролиферативная активность; противоопухолевая активность; моноклональные антитела; ангиогенные факторы роста опухолей.

Антрациклины до настоящего времени остаются наиболее широко используемой в клинике и хорошо изученной группой противоопухолевых антибиотиков. Первые препараты этой группы даунорубицин (дауномицин, рубомицин, I) и доксорубицин (адриамицин, II), клиническое изучение которых началось еще в начале шестидесятых-семидесятых годов, по сей день используются в химиотерапии опухолевых заболеваний (рис. 1) [1, 2]. Антибиотик II является основой большинства терапевтических режимов при лечении лейкозов, солидных опухолей, включая рак молочной железы, мелкоклеточного рака легкого, сарком, дет-

ских опухолей и гемобластозов. I применяется в основном для лечения лейкозов у взрослых и детей [3].

Механизм цитотоксического действия антрациклиновых антибиотиков связан, главным образом, с ингибированием синтеза нуклеиновых кислот путем интеркаляции между парами азотистых оснований, нарушением вторичной структуры ДНК, ингибированием работы топоизомеразы II, топоизомеразы I, а также связыванием с липидами клеточных мембран, сопровождающимся изменением транспорта ионов и клеточных функций [4, 5]. Такой механизм обуславливает высокую антипролиферативную активность при достаточно низкой избирательности действия. Одним из основных побочных эффектов применения антрациклинов является потенциально необратимая кумулятивная дозозависимая кардиотоксичность, которая предположительно обусловлена свободнорадикальным повреждением клеточных мембран миокарда [6]. Антрациклиновые антибиотики обладают также эмбриотоксическими, мутагенными и тератогенными свойствами. Наличие серьезных побочных эффектов лечения антрациклиновыми антибиотиками, а также устойчивость опухолевых клеток к применяемым цитостатикам обуславливают актуальность поиска новых производных и аналогов антрациклинов [7]. Один из современных подходов к получению желаемого "идеального" противоопухолевого препарата, обладающего высокой селективностью и низкой токсичностью, заключается в создании пролекарств и использование методов направленной доставки цитостатиков к опухолевым клеткам. Перспективным направлением модификации антрациклиновых антибиотиков является создание конъюгатов с различными макромолекулами, последним достижениям в этой области посвящен настоящий обзор.

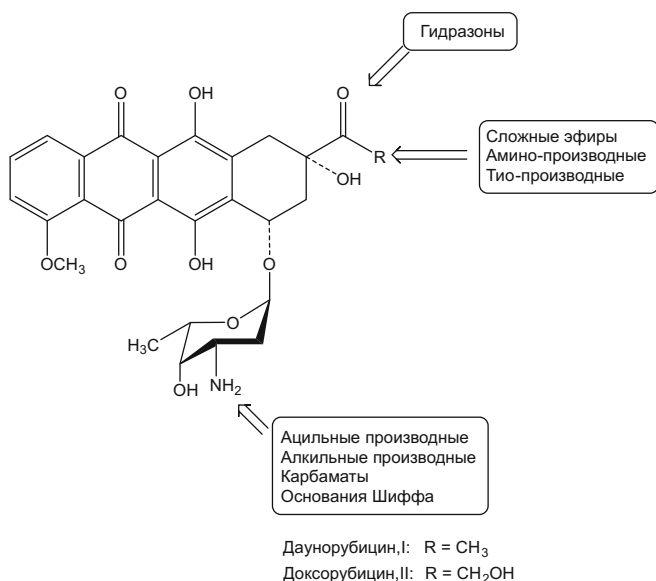


Рис. 1. Структура природных антрациклиновых антибиотиков I и II, основные группы и типы связей, используемые для конъюгации с макромолекулами.

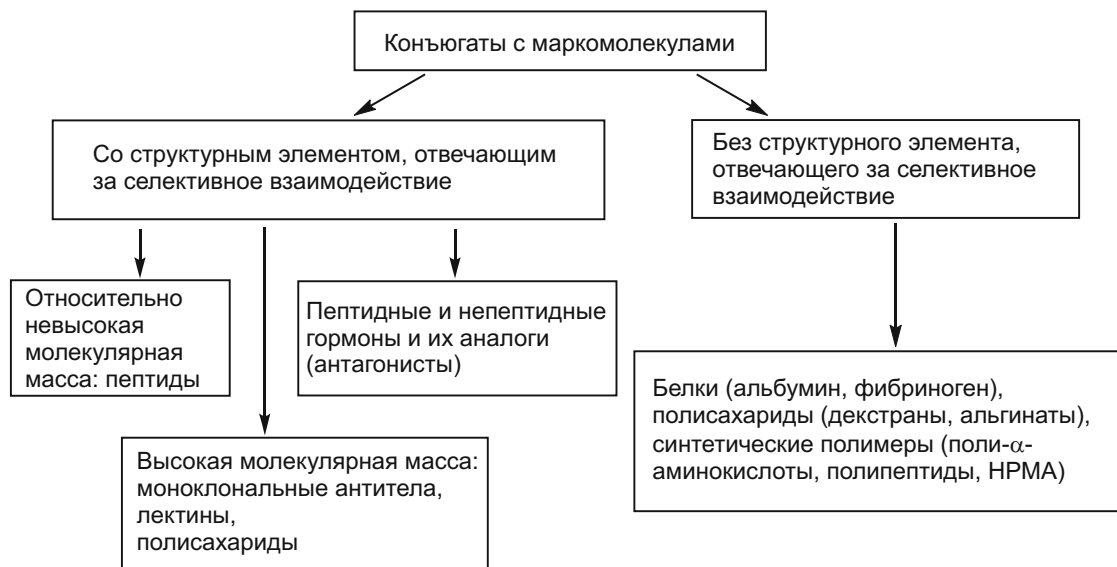


Рис. 2. Классификация конъюгатов макромолекул с антрациклиновыми антибиотиками. HPMA — поли-[N-(2-гидроксипропил)метилакриламид].

Основными группами, с помощью которых возможно осуществление привязки антрациклинового антибиотика к макромолекуле, являются 3'-аминогруппа в остатке даунозамина, 13-кетогруппа и положение 14 антрациклина (рис. 1).

Анализ экспериментальных данных свидетельствует, что конъюгаты антрациклинов с макромолекулами могут быть классифицированы в зависимости от размера макромолекулы и наличия или отсутствия в ней структурного элемента, отвечающего за селективное связывание (взаимодействие) с определенными структурами клеточной мембраны или цитоплазмы (рис. 2) [8].

Первая группа включает производные антрациклинов с относительно короткими пептидами, распознающими рецепторы к различным гормонам. Ко второй группе можно отнести конъюгаты противоопухолевых антибиотиков с пептидными и непептидными гормонами и их аналогами, взаимодействующими с соответствующими рецепторами на поверхности клетки. Третья группа включает конъюгаты, имеющие относительно большой молекулярный вес (> 10000 Да) и обладающие структурным элементом, ответственным за селективное специфическое связывание с компонентами опухолевой клетки. Примерами являются конъюгаты с моноклональными антителами, иммуноглобулинами, лектинами, трансферинами. Четвертая группа включает конъюгаты с биополимерами, не имеющими структурных элементов, способных к селективному связыванию с компонентами клеточной мембраны или цитоплазмы.

Производные антрациклиновых антибиотиков, взаимодействующие с рецепторами опухолевых клеток

Для опухолевых клеток характерна не только гиперэкспрессия определенных ферментов, но и наличие на поверхности клеток большего числа различных рецепторов, чем это характерно для нормальных клеток. В

настоящее время установлены структуры нескольких пептидных мотивов, способных связываться с теми или иными рецепторами на поверхности опухолевых клеток [9]. Наибольшие перспективы обещают исследования рецепторов, необходимых для ангиогенеза (разрастания кровеносной системы).

Ангиогенные факторы

Посредством создания обширных фаговых библиотек и экспрессии фагами различных пептидов установлены последовательности пептидных фрагментов, способных селективно связываться с рецепторами, присутствующими в опухолевых тканях, в том числе способных распознавать ангиогенные факторы [10]. Нацеливание цитостатиков на ангиогенез может быть особенно эффективно, поскольку смерть одной эндотелиальной клетки приводит к гибели значительного числа опухолевых клеток [11].

Установлено, что моноклический CNGRC (NGR) и бициклический CDCRGDCFC (RGD-4C) пептиды распознают опухолевые клетки [12]. (Отметим, что в обзоре использованы два типа обозначений аминокислот — однобуквенный и трехбуквенный. Аланин — Ala, A; аргинин — Arg, R; аспарагин — Asn, N; аспарагиновая кислота — Asp, D; цистеин — Cys, C; глутамин — Gln, Q; глутаминовая кислота — Glu, E; глицин — Gly, G; гистидин — His, H; лейцин — Leu, L; лизин — Lys, K; метионин Met, M; фенилаланин — Phe, F; пролин — Pro, P; серин — Ser, S; треонин — thr, T; триптофан — Trp, W; тирозин — Tyr, Y; валин — Val, V).

Пептид RGD-4C связывается с $\alpha_v\beta_3$ рецептором к интегрину, а пептид NGR связывается с рецептором к аминопептидазе N. Идентифицированы последовательности пептидов, связывающихся с клетками рака молочной железы и меланомы. Синтезированы различные производные антрациклиновых антибиотиков, в частности II, содержащие пептидные фрагменты

Производные амидного типа

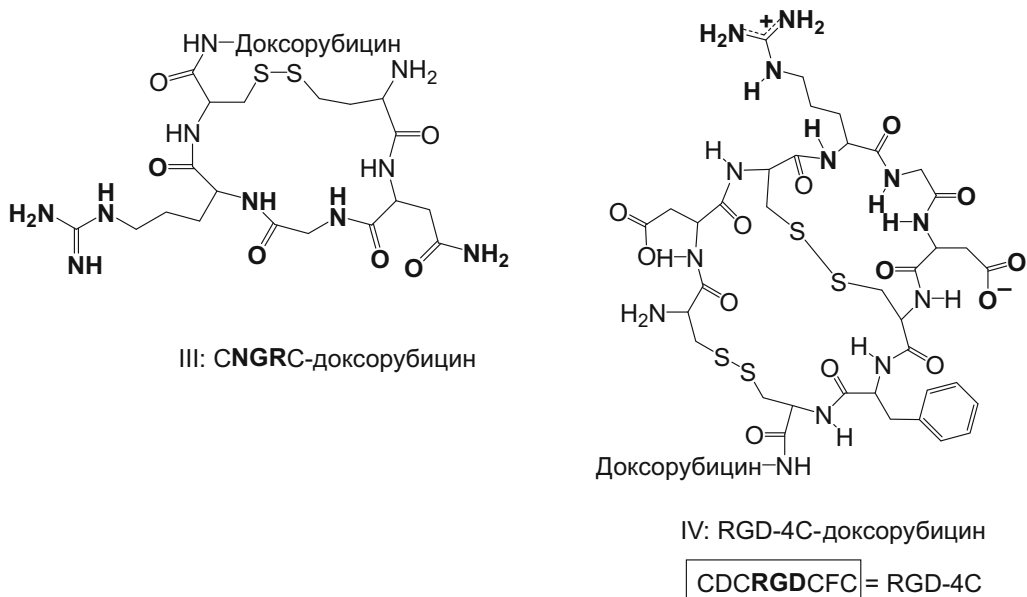


Рис. 3. Пептидные производные доксорубина [10, 13].

RDG, NGR, GSL, NGRAHA, CNGRC, CDCRGDCFC, CNGRCVSGCAGRГ и CGSLVRC [10, 13].

Структуры конъюгатов II с циклическими пептидами NGR (III) и RGD-4C (IV) представлены на рис. 3. Изучение производных III, IV в экспериментах *in vivo* показало их преимущества перед II, а именно меньшую токсичность и большую эффективность [10].

Описаны также производные II, содержащие аминокислотные последовательности TAASGVRSMH и LTLRWVGLMS. Было показано, что эти пептиды и содержащие их конъюгаты с II связываются с протеогликаном меланомы NG2 [10]. Этот ангиогенный маркер, представляющий собой высокомолекулярный пептидогликан, экспрессируется клетками различных видов опухолей, в том числе меланомы и лейкоза.

С целью повысить химиотерапевтический индекс антрациклиновых антибиотиков получены конъюгаты с пептидами, распознающими рецепторы к различным гормонам.

Так описаны конъюгаты II и 3'-дезамино-3'-(2-пирролино)доксорубина (IIa) с пептидными аналогами гормона, инициирующего выделение лютеинизирующего гормона (LH-RH) (соединения V и VI соответственно), бомбесина (VII и VIII соответственно) и соматостатина (IX и X соответственно), в которых пептиды присоединены к 14-гидрокси группе II или IIa через спейсер — дикарбоновую кислоту (рис. 4) [14].

Полученные производные V–X со сложноэфирным типом сшивки с пептидами были достаточно стабильны, обладали высокой антипролиферативной активностью и сохраняли способность связываться с соответствующими рецепторами. Конъюгаты, содержащие LH-RH пептид (V, VI), в эквимоларных концентрациях были более эффективны, чем родительские антибиотики (II и IIa) в экспериментах *in vivo* [14]. Конъюгаты, содержащие аналог бомбесина VII, VIII, также показали хорошие результаты при лечении

мышей с мелкоклеточным раком легкого. При более низкой токсичности производные VII, VIII по своей эффективности в эквимоларных концентрациях превосходили родительские антибиотики (II и IIa) [14]. Эффективность лечения раковых опухолей конъюгатами, содержащими аналог соматостатина (IX, X), была достигнута только для тех видов опухолей (например, глиобластомы), клетки которых экспрессируют рецепторы к соматостатину [14]. Расширенные предклинические испытания синтезированных аналогов показали их высокую противоопухолевую активность на различных моделях *in vivo* [15–18].

Несмотря на многообещающие данные об эффективности производных V–X в экспериментах *in vivo*, хотелось бы отметить два потенциальных недостатка этих конъюгатов: во-первых, эти производные обладают высокой цитотоксичностью, что может привести к повреждению нормальных клеток до того момента, когда эти конъюгаты свяжутся с соответствующими рецепторами, а во-вторых, сложноэфирная связь в положении 14 антрациклина способна расщепляться под действием неспецифических карбоксиэстераз [19].

Пептиды, проникающие в клетку

Пептиды, проникающие в клетку (cell-penetrating peptides, CPP), — группа коротких, часто гидрофильных пептидов, обладающих высокой способностью проникать через клеточную мембрану. Наиболее исследованными CPP являются TAT-пептид (GRKKRRQRRRPQ) и пенетратин (RQIKIWFQNRRMKWKK) [20].

Синтезирован конъюгат TAT-пептида и II с амидным типом сшивки (XI) (рис. 5) и установлено, что он обладает сравнимой с II антипролиферативной активностью и повышенной способностью по сравнению с II накапливаться в цитоплазме опухолевых клеток [21].

Производные со сложноэфирной связью:

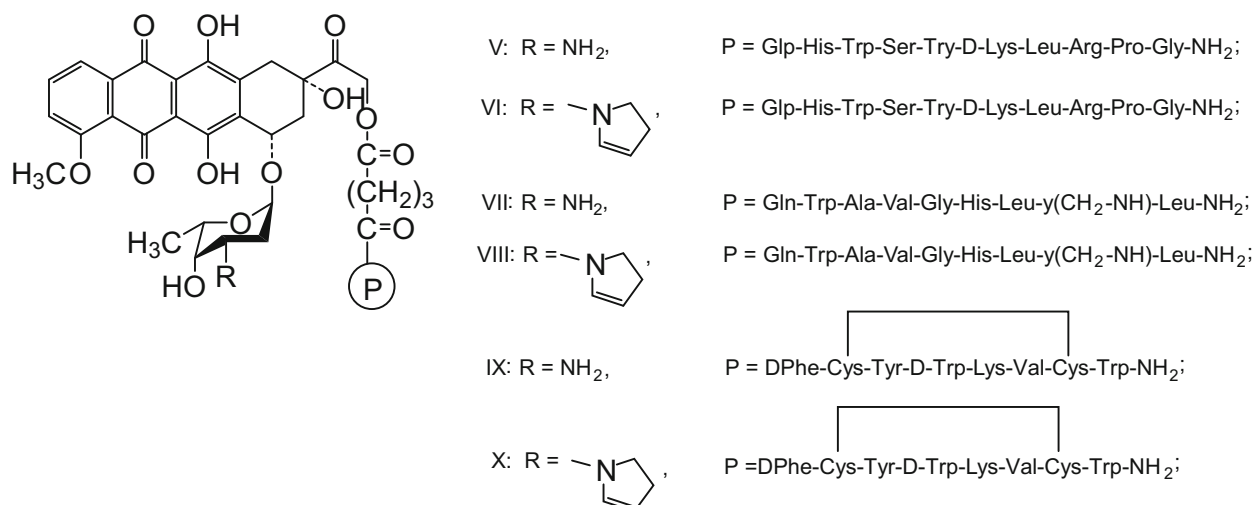


Рис. 4. Конъюгаты доксорубина и 3'-дезаминно-3'-(2-пирролино)доксорубина (IIa) с аналогами пептидных гормонов [14].

Производное амидного типа

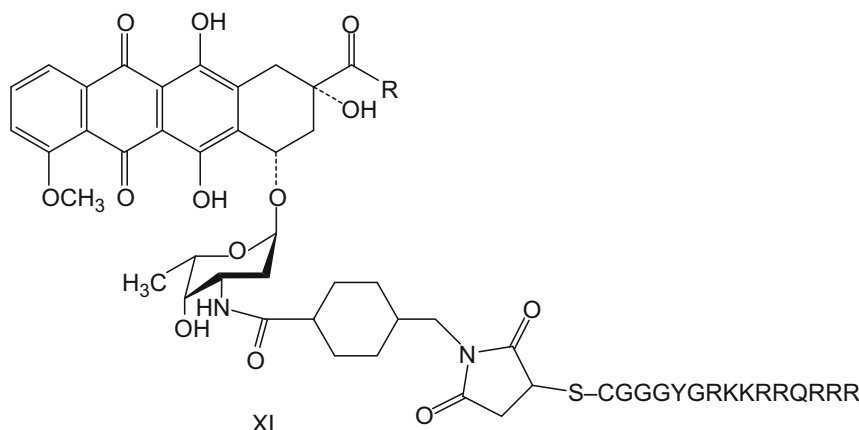


Рис. 5. Конъюгат доксорубина с TAT-пептидом [21].

Важно, что конъюгат XI обладал активностью в отношении опухолевых клеток MCF7/ADR и AT3B-1, устойчивых к II за счет гиперэкспрессии белка-насоса Pgp-1 [22].

Конъюгат II с пенетратином, в котором пептид присоединен к 3'-аминогруппе антибиотика через спейсер, содержащий сукцинат и тиоэфирную группу, также был более активен, чем исходный цитостатик в отношении клеток K562/ADR, устойчивых к II [23].

Предположительно конъюгаты II с ССР не являются субстратами Р-гликопротеина (Pgp), что обеспечивает им активность в отношении резистентных опухолевых клеток.

Конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с гормонами

Нейропептид Y. Получение конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с гормонами направлено на селективную доставку цитостатиков к опухолевым клеткам, экспрессирующим рецепторы к этим гормонам.

Описаны конъюгаты I и II с нейропептидом Y (NPY) (рис. 6) амидного типа [24].

Нейропептид Y состоит из 36 аминокислотных остатков, рецепторы к нему экспрессируют клетки нервной системы и мозга, однако уровень экспрессии рецепторов к нейропептиду Y у опухолевых клеток различных нейробластом намного выше, чем у нормальных клеток. Таким образом, нейропептид Y может быть использован в качестве вектора для селективной доставки цитостатиков к опухолевым клеткам, экспрессирующим рецепторы к нейропептиду Y. Синтезированы конъюгаты I и II с нейропептидом Y, в которых нейропептид был присоединен через имид яблочной кислоты и ароматический ацильный спейсер к 3'-аминогруппе даунозамина (производные XII и XIII), либо связан через имид яблочной кислоты и ароматический спейсер в виде гидразона с 13-кетогруппой I (XIV). Полученные конъюгаты XII – XIV сохраняют

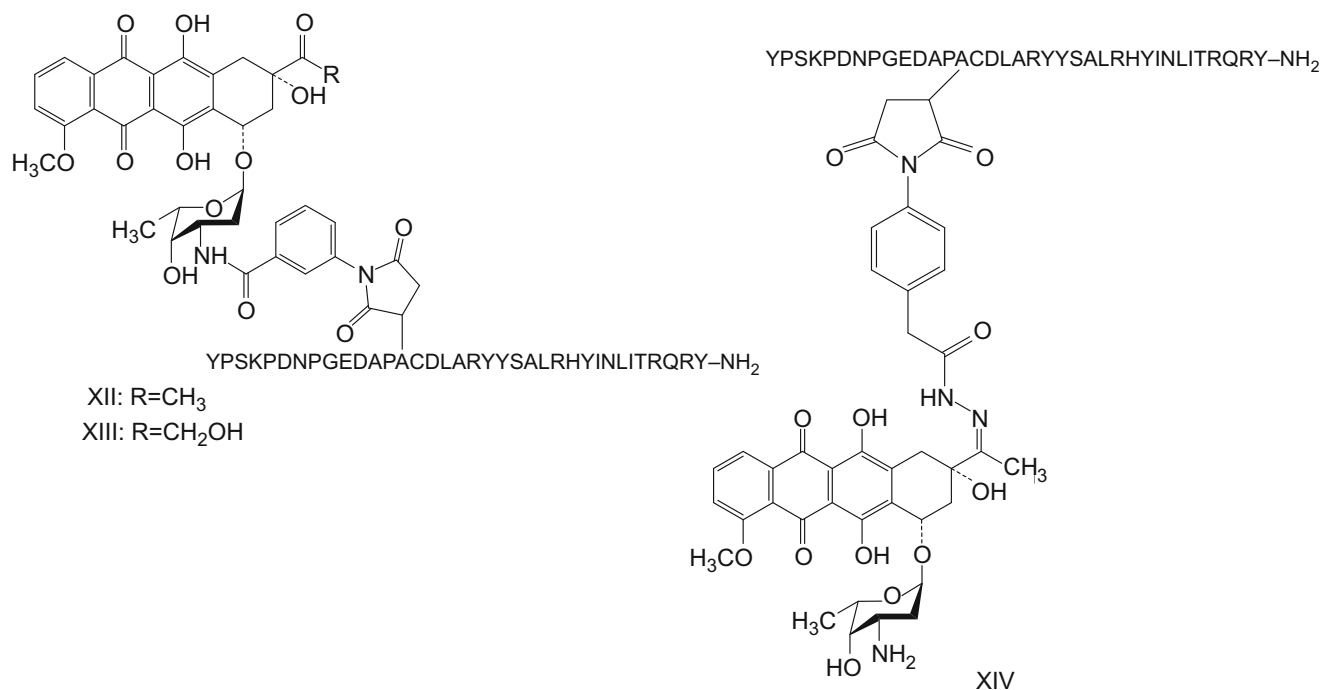


Рис. 6. Конъюгаты даунорубицина и доксорубицина с нейропептидом Y [24].

способность селективно связываться с рецепторами к нейропептиду. Из 3 изученных конъюгатов XII – XIV только XIV обладал цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток линии SK-N-MC, экспрессирующих рецепторы к нейропептиду Y. Показано, что антипролиферативная активность конъюгата XIV связана с наличием рецепторов к нейропептиду Y на поверхности опухолевых клеток. Разница в активности конъюгатов XII, XIII и XIV может быть объяснена различной устойчивостью связи между молекулой антрациклинового антибиотика и спейсером. В случае конъюгатов XII, XIII — это стабильная как при кислых, так и при нейтральных значениях pH амидная связь, в конъюгате XIV спейсер присоединен к 13-кетогруппе I через кислото-лабильную гидразонную связь. Авторы считают, конъюгат XIV должен быть достаточно устойчив во внеклеточном пространстве, а после эндоцитоза внутри клетки гидразонная связь должна довольно быстро гидролизироваться с выделением свободного I, вызывающего цитотоксические эффекты. В случае же конъюгатов XII, XIII, по-видимому, не происходит деградации стабильной амидной связи, что объясняет отсутствие антипролиферативной активности у этих производных.

Эпидермальный фактор роста

Повышенный уровень экспрессии рецепторов к эпидермальному фактору роста (EGF) характерен для различных видов опухолевых клеток, в том числе клеток плоскоклеточной карциномы, рака молочной железы и эндотелиальных клеток. Кроме того, рецепторы к EGF играют важную роль в регулировании клеточного роста и онкогенеза. Описаны конъюгаты II с

EGF типа основания Шиффа, а также с его рецептор-связывающим фрагментом (EGFfr) [25]. Антибиотик присоединяли к EGF или EGFfr через спейсер — остаток глутарового диальдегида (схема 1).

Было показано, что конъюгаты II с EGF и EGFfr обладали большей антипролиферативной активностью, по сравнению с II, в отношении клеток MCF-7Wt, экспрессирующим рецепторы к EGF. Более того, синтезированные конъюгаты были намного более активны, чем II в отношении устойчивых опухолевых клеток

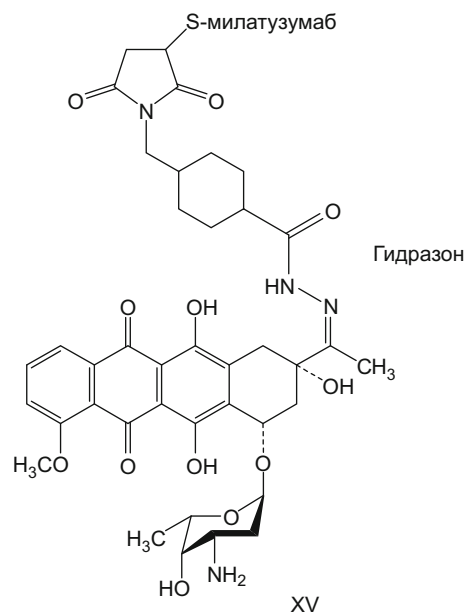


Рис. 7. Структура конъюгата доксорубицина с милатузумабом [30, 31].

Основания Шиффа

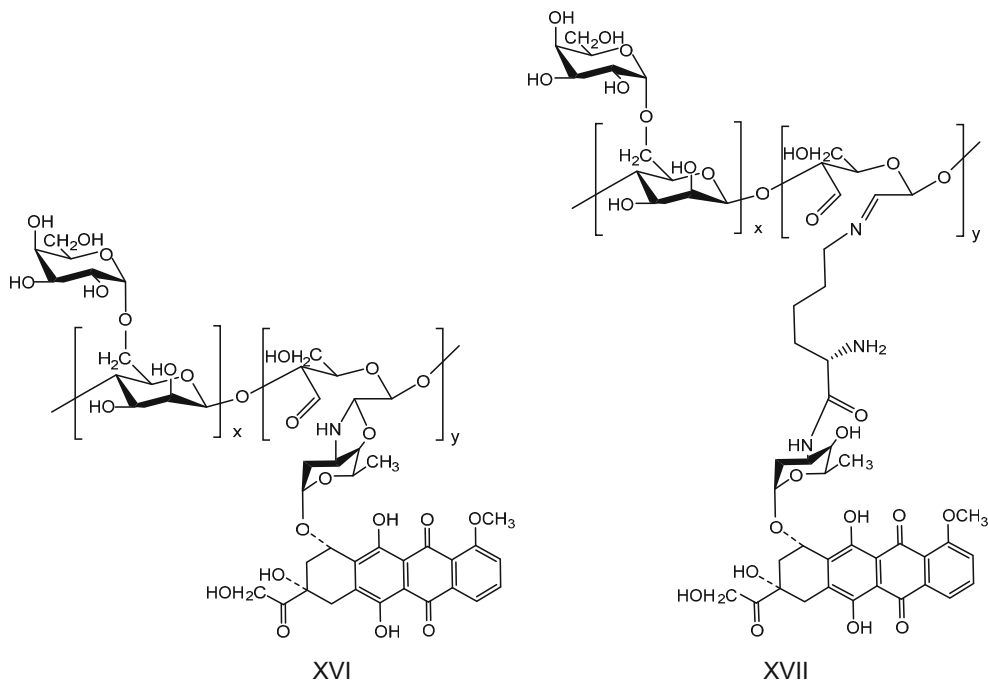


Рис. 8. Конъюгаты доксорубина с DAVANAT® [35].

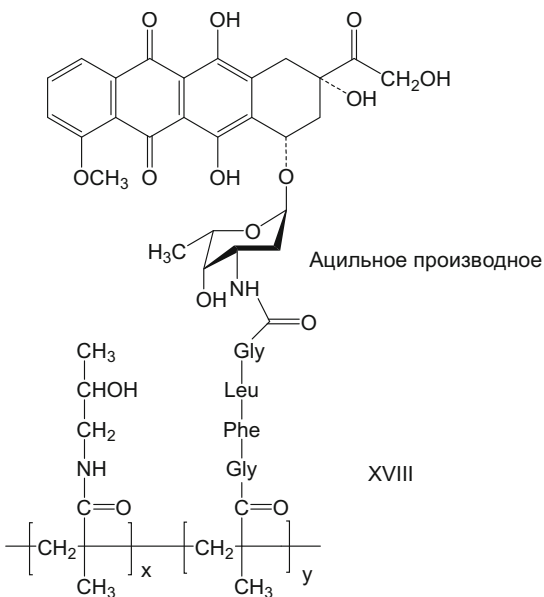


Рис. 9. Конъюгат доксорубина с HMPA [37].

линии MCF-7Adr. Отмечено, что пролиферирующие эндотелиальные клетки значительно более чувствительны к действию конъюгатов II с EGF и EGFfr, чем покоящиеся эндотелиальные клетки. Активность обоих конъюгатов была также подтверждена в экспериментах *in vivo*.

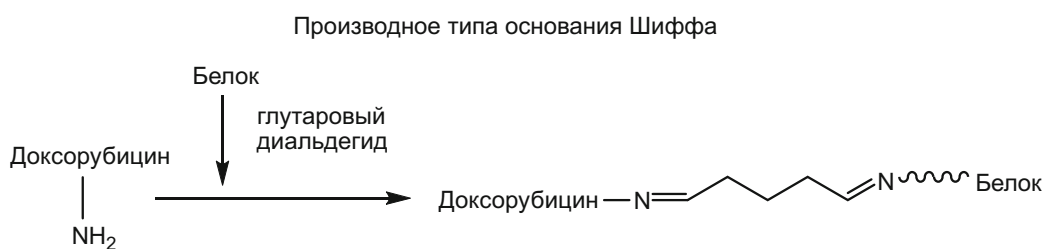
Конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с макромолекулами, селективно взаимодействующими с компонентами клеток

Конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с трансферринами

Интенсивно исследовались конъюгаты II с трансферринами — гликозилированными белками плазмы крови, осуществляющими транспорт ионов железа. Синтез конъюгатов осуществляли взаимодействием глутарового диальдегида с аминогруппами белка и антибиотика (схема 1) [26].

Показано, что конъюгаты II с трансферринами гораздо более активны, чем исходный антибиотик II в

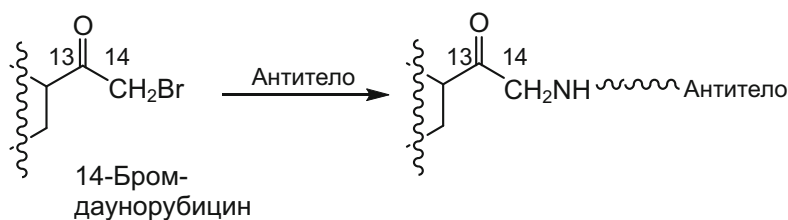
Схема 1



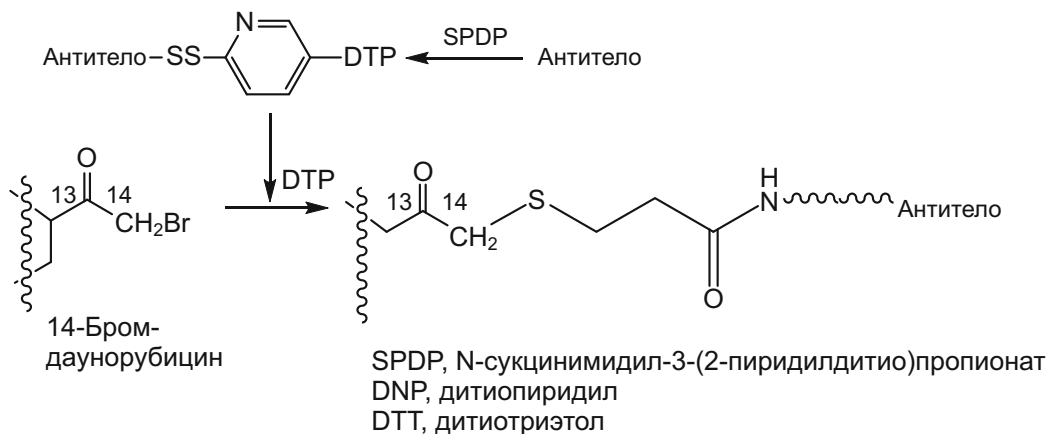
Синтез конъюгатов доксорубина с трансферринами [25].

Схема 2

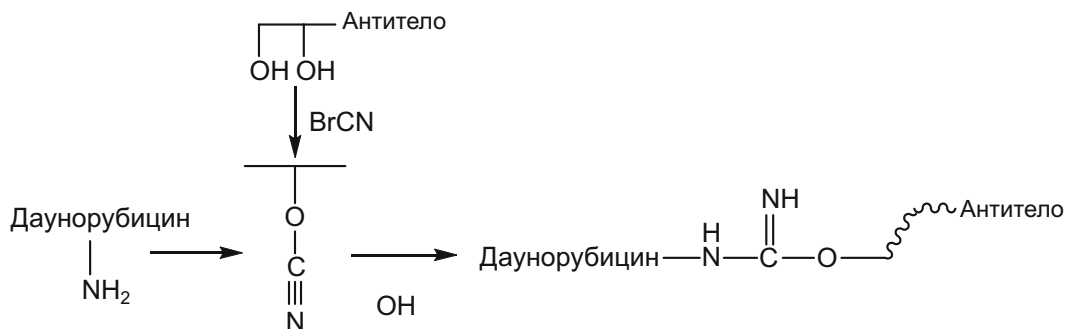
1) Производные аминного типа:



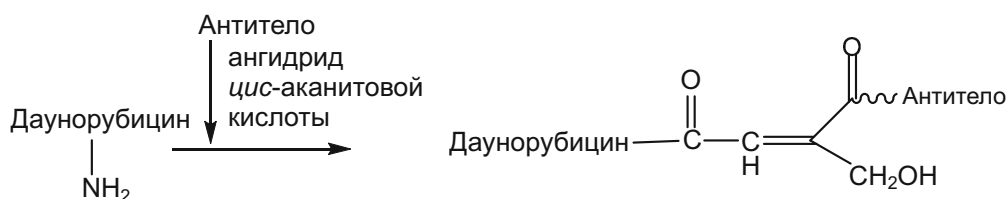
2) Тиопроизводные:



3) Производные иминоуретанового типа:



4) Производные ацильного типа:



Различные варианты синтеза конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с антителами на примере даунорубина.

отношении опухолевых клеток линий K562/ADR, HL-60/ADR, KB-C1, KB-V1 и HL-60/ADR устойчивых к II [26, 27].

Конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с антителами

Получение конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с различными антителами представляет боль-

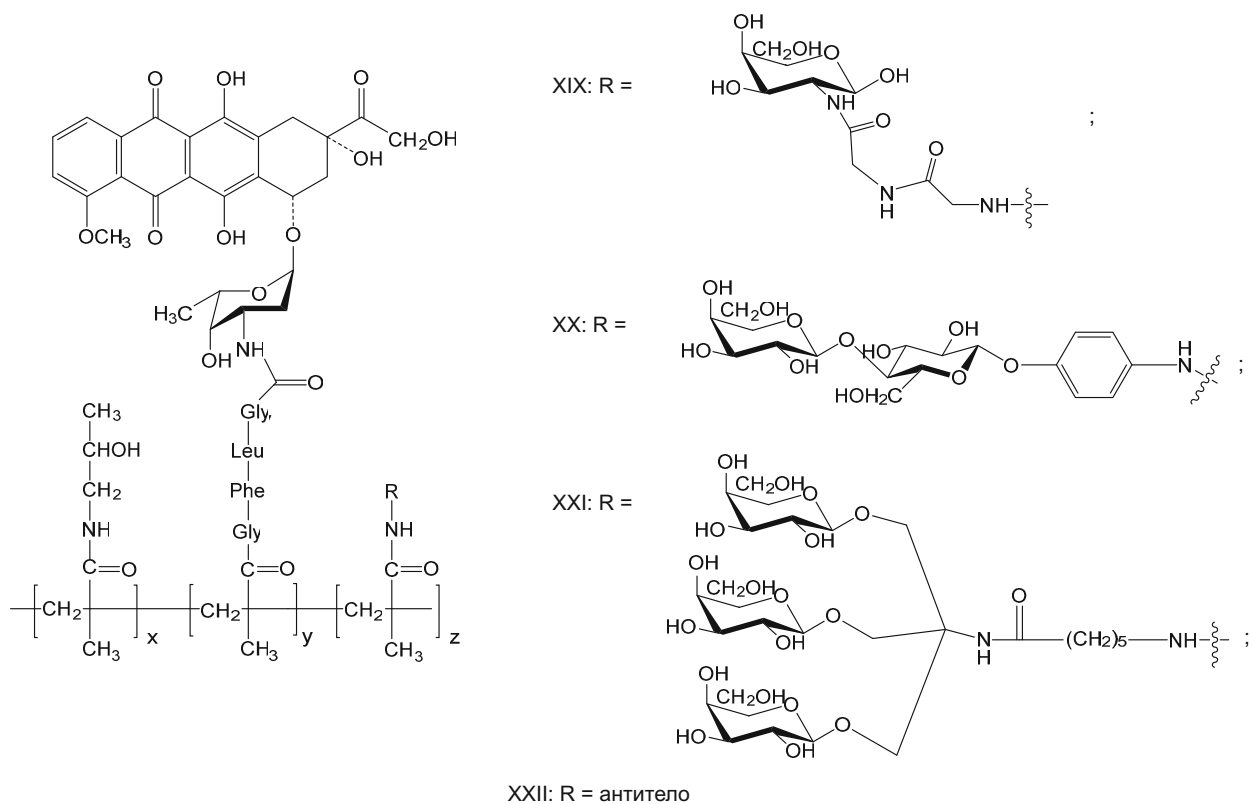


Рис. 10. Конъюгаты доксорубина с НМРА, содержащие дополнительные фрагменты, ответственные за селективное взаимодействие со структурами клетки [46, 47].

шой интерес, благодаря возможности направленной доставки антрациклинов к опухолевым клеткам.

Было получено большое число таких иммуноконъюгатов, различающихся как способом присоединения молекулы антрациклина к антителу, так и природой антител [28]. Ковалентное присоединение молекулы антрациклина к антителу возможно как напрямую, так и с использованием макромолекулярного спейсера (схема 1, 2). По схеме 1 получены конъюгаты II с антителами к α -фетопротейну и к антигену эмбриокарциномы [29]. Полученные конъюгаты в экспериментах *in vitro* в эквитоксических дозах были столь же активны, как и свободный II.

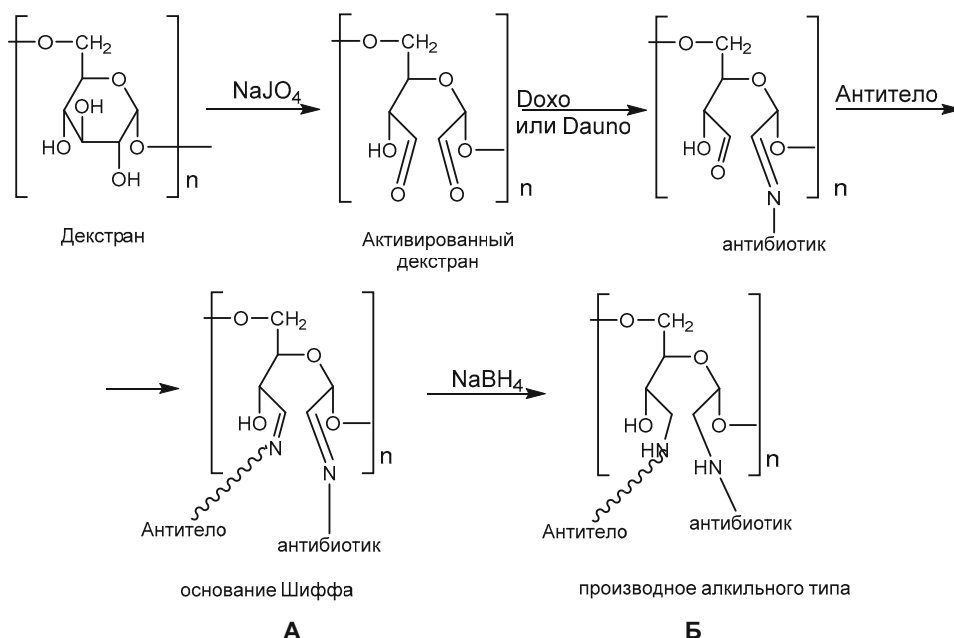
Для присоединения I к антителу по 14-му положению антибиотика используют 14-бромдаунорубидин, которым алкилируют либо аминогруппы антитела (схема 2, 1), либо дисульфидное производное антитела (схема 2, 2).

Другой подход — получение активированного производного антитела реакцией с бромцианом, к которому затем по 3'-аминогруппе присоединяют молекулу антрациклинового антибиотика (схема 2, 3). Описано также активирование антитела реакцией с ангидридом дикарбоновой кислоты, например, с ангидридом *цис*-аканитовой кислоты, после чего проводят присоединение молекулы антрациклинового антибиотика по второй карбоксильной группе амидной связью (схема 2, 4) [28].

Среди различных вариантов присоединения (схема 2, 1–4) I к различным антителам, включая антитела к остеогенной саркоме и α -фетопротейну, только один конъюгат I с α -фетопротейном, в котором антибиотик был присоединен через остаток *цис*-аканитовой кислоты, обладал заметной антипролиферативной активностью. Изучение значительного количества различных вариантов синтезированных конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с антителами позволили сделать вывод о том, что в принципе неважно, в каком положении в молекуле антрациклина осуществляется его присоединение к антителу или спейсеру, главное, чтобы эта связь была расщепляема в организме. Использование полностью негидролизуемой связи, как, например, алкиламинной, сульфидной или алкильной, приводит к потере антипролиферативной активности конъюгатов.

В случае присоединения антрациклинового антибиотика к антителу напрямую не удастся получить большую нагрузку антрациклина в конъюгате. Использование спейсера между остатком антрациклинового антибиотика и антителом позволяет повесить нагрузку антрациклина в конъюгате без потери способности антитела селективно взаимодействовать с антигеном. Большую эффективность конъюгатов, в которых молекула антрациклина присоединена к антителу через спейсер, обеспечивает также увеличение расстояния между цитостатиком и антителом.

Схема 3



Получение конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с антителами [28].

Синтезирован и широко изучается конъюгат II с милатузумабом (XV) — моноклональным антителом к CD74, разработанный для лечения множественной миеломы (рис. 7) [30, 31].

В конъюгате антибиотик присоединен к спейсеру через 13-гидразонную связь, а антитело — через дисульфидную. Производное XV — единственный конъюгат антрациклинового антибиотика с моноклональным антителом, проходящий в настоящее время клинические испытания (стадия I/II) [32].

В качестве спейсеров между молекулой антрациклина и антителом исследовались также декстран и полиэтиленгликоль.

Так, одним из вариантов присоединения молекулы антрациклинового антибиотика к декстрану является образование иминной связи (основание Шиффа) между 3'-аминогруппой остатка даунозамина и альдегидными группами декстрана, полученными в результате периодатного расщепления полисахарида. К полученному конъюгату также иминной связью могут быть присоединены антитела (схема 3).

Показано, что в случае антрациклиновых антибиотиков иминные связи (вариант А) между 3'-аминогруппой остатка даунозамина и альдегидными группами окисленного декстрана являются стабильными в нейтральных и слабощелочных средах и только частично гидролизуются в слабокислых средах, что может быть объяснено образованием оксазолидинового цикла между вицинальными амино- и гидроксильными группами в остатке даунозамина [28].

Связь между антителом и декстраном также является устойчивой, что может быть объяснено множественностью сайтов связывания антитела и окисленного декстрана. Тем не менее в некоторых случаях имин-

ные связи в конъюгате восстанавливали до аминных (вариант Б) (схема 3).

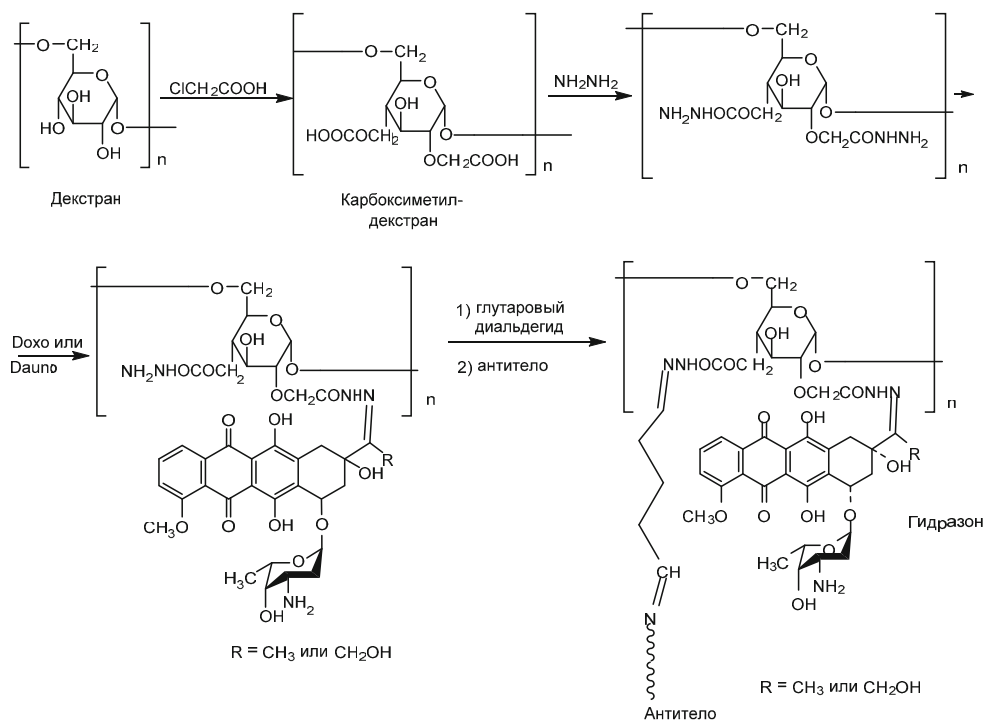
По схеме 3 получены различные конъюгаты I и II с антителами против лейкоза, плазматомы, Т лимфомы и карциномы [28]. Молекулярная масса декстрана, использовавшегося в качестве спейсера в таких конъюгатах, была около 10000 Да. Полученные конъюгаты обладали цитотоксичностью в экспериментах *in vitro* и сохраняли способность антитела селективно распознавать соответствующий антиген [28].

Другой метод получения конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с полисахаридом декстраном основан на получении из декстрана карбоксиметилдекстрана реакцией с хлоруксусной кислотой, получении из карбоксиметилдекстрана соответствующего гидразид-декстрана и присоединении антрациклинового антибиотика II или I к остаткам гидразина через 13-кетогруппу. Присоединение антитела осуществляли через глutarовый диальдегид (схема 4).

По схеме 4 были получены конъюгаты I и II с антителами против нейробластомы [28]. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* свидетельствуют о том, что некоторые конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с антителами, присоединенными через декстрановый спейсер, могут представлять интерес для дальнейшего клинического изучения, например, конъюгат I с антителами к α -фетопротейну, полученный по схеме 4 без восстановления иминных связей (молекулярная масса декстрана, использовавшегося в качестве спейсера ~ 10000) [28].

Подводя итог, хотелось бы отметить несколько факторов, касающихся конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с антителами. Во-первых, в большинстве случаев антитела к опухолевым клеткам (и их конъю-

Схема 4



Получение конъюгатов доксорубина и даунорубина с антителами, в которых остаток антрациклина присоединен к декстрану через 13-кетогруппу, а антитело — через глутаровый диальдегид [28].

гаты с цитостатиками) используют разницу в экспрессии антигена в опухолевых клетках и в нормальных тканях, и, следовательно, полностью избежать повреждающего действия цитостатиков на нормальные ткани не удастся. Во-вторых, эффективность конъюгата цитостатика с антителом, вероятно, будет высока в случае, если опухоль имеет развитую кровеносную систему или хороший контакт с межклеточной жидкостью, что не всегда имеет место. Третьей серьезной проблемой является необходимость проникновения конъюгата антитела с цитостатиком внутрь опухолевой клетки, что происходит далеко не во всех случаях. Другими проблемами, характерными для иммуноконъюгатов антрациклиновых антибиотиков с антителами, являются сложности синтеза, высокая себестоимость получающихся препаратов, гетерогенность получаемых антител, обычно невысокая стабильность полученных конъюгатов, и не очень высокая нагрузка цитостатика в конъюгате.

Конъюгаты II с галактоманнаном

Описаны конъюгаты II с полисахаридом DAVANAT® (или GM-CT-01), являющимся продуктом контролируемого частичного гидролиза полисахарида из семян *Cyamopsis tetragonoloba* или *Guar gum* [33]. DAVANAT® представляет собой 1,4-β-D-галактоманнан, состоящий из (1 → 4)-β-D-маннопиранозильных субъединиц, к которым присоединены остатки α-D-галактопираноз. За счет остатков D-галактозы DAVANAT® способен взаимодействовать с лектинами – рецепторами к углеводам [34]. DAVANAT® прошел

вторую фазу клинических испытаний как препарат, усиливающий действие цитотоксических агентов и смягчающий побочные эффекты химиотерапии. Получены конъюгаты II с DAVANAT®, отличающиеся нагрузкой антибиотика и способом его присоединения к полисахариду — напрямую (XVI) или через спейсер (XVII) (рис. 9) [35].

Полученный водорастворимый конъюгат XVI типов оснований Шиффа сохраняют антипролиферативную активность в отношении 3 линий опухолевых клеток: мышинной меланомы B16-F1, рака молочной железы MCF-7 и рака кишечника HT-29 (НТВ-38).

Конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с макромолекулами, не обладающими способностью селективно взаимодействовать с компонентами клеток

Конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с поли-[N-(2-гидроксипропил)метилакриламидом]

Одним из самых удачных примеров использования синтетических полимеров для доставки антрациклинов в опухолевые ткани является конъюгат II с поли-[N-(2-гидроксипропил)метилакриламидом] (НМРА) (XVIII) (рис. 8) [36]. Антибиотик II через 3'-аминогруппу присоединен к олигопептидному спейсеру, который, в свою очередь, присоединен к НМРА. Механизм действия конъюгата XVIII интенсивно изучался [37 – 42]. Установлено, что конъюгат проникает в клетку путем эндоцитоза, затем в лизосомах происходит гидролиз расщепляемого пептидного

спейсера между молекулой антибиотика и полимером и высвобождается свободный II.

В экспериментах *in vivo* конъюгат XVIII оказался высоко активным в отношении ряда опухолевых линий, особенно солидных опухолей, при этом наблюдалось заметное снижение общей токсичности. Следует отметить, что конъюгат II с НМРА XVIII был активен при лечении мышей с MDR-резистентными опухолями [43]. Изучение фармакокинетических характеристик полимера XVIII показало, что после его введения внутривенно, уровень II в плазме находится на невысоком, но постоянном уровне, в то время как после внутривенного введения II в плазме наблюдается резкое повышение концентрации II с последующим быстрым ее падением [43]. Конъюгат XVIII был первым производным синтетического полимера и противоопухолевого агента, допущенным до клинических испытаний. В настоящее время XVIII находится на второй фазе клинических испытаний [44].

Описаны также различные модификации конъюгатов II с НМРА.

Например, изучались возможности присоединения II к полимеру через другие пептидные спейсеры, в том числе присоединенные не к 3'-аминогруппе, а к 13-кетогруппе II в виде гидразона [45]. Показано, что конъюгаты, в которых II присоединен через кислото-лабильную связь (гидразон по 13-кетогруппе), обладают значительно большей цитотоксичностью по сравнению с конъюгатами, в которых II присоединен к полимеру через протеолитически деградирующую связь.

Для того чтобы повысить селективность накапливания конъюгата II с НМРА в опухолевых тканях, в него дополнительно вводили различные биораспознаваемые группы, например, углеводные остатки или антигена [46, 47].

Показано, что введение в конъюгат остатков моно-, ди- и трисахаридов (галактозамина, лактозы и три-Gal соответственно) (рис. 10) приводило к значительному повышению активности по сравнению с негликозилированным конъюгатом XVIII в отношении клеток различных линий аденокарциномы человека (Colo-205, SW-480 и SW-620). Авторы объясняют это лучшим распознаванием гликозилированных конъюгатов XIX – XXI опухолевыми клетками и их проникновением внутрь клеток посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза [46]. Предполагается также, что за распознавание конъюгата II с НМРА, несущим на себе дополнительные углеводные фрагменты, ответственны рецепторы типа галектинов, а также другие рецепторы, роль которых пока не установлена.

Конъюгат II с НМРА, содержащий дополнительный остаток галактозамина (XIX), в настоящее время также находится на второй фазе клинических испытаний [47].

Введение в конъюгат II с НМРА моноклональных антител, нацеленных на определенные эпитопы на поверхности опухолевых клеток, повысило эффективность лечения мышей с лимфомой EL4, по сравнению с “ненацеленным” конъюгатом XVIII (рис. 10) [48].

Конъюгат XVIII испытывался также как часть двухступенчатой стратегии “фермент — пролекарство”. Пептидный спейсер Gly-Phe-Leu-Gly является субстратом для катепсина В. Изучены различные возможности селективной доставки катепсина В в опухолевые клетки, в том числе в виде конъюгата с антителами (ADEPT) или полимерами (PDEPT). В последнем случае катепсин В через пептидный спейсер Gly-Gly был присоединен к НМРА. Имобилизованный катепсин В сохранял способность гидролизовать пептидный спейсер в конъюгате XVIII, однако его активность была значительно ниже, чем у свободного фермента. Комбинация имобилизованного на полимере катепсина В и конъюгата XVIII изучена в экспериментах *in vivo* на мышах с меланомой B16F10. Показано, что концентрация свободного II в опухолевых тканях выше в случае введения XVIII совместно с имобилизованным катепсином В. В целом же повышение эффективности лечения мышей комбинацией имобилизованного катепсина В и конъюгата XVIII было крайне незначительным по сравнению с монотерапией конъюгатом XVII [9].

Конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с полиэтиленгликолем

Другим синтетическим полимером, используемым для конъюгации с антрациклиновыми антибиотиками, является полиэтиленгликоль (PEG). Описаны различные конъюгаты I с PEG ацильного типа, отличающиеся структурой спейсера между молекулой антрациклинового антибиотика и полимером (XXIII, схема 5) [49].

Показано, что после гидролиза эстеразами эфирной связи в спейсере происходит быстрая внутримолекулярная реакция образования циклического лактона, что приводит к высвобождению I из конъюгата с полимером (схема 5). Один из конъюгатов I с PEG (XXIII) в экспериментах *in vivo* был более эффективен для лечения опухолей яичников, чем I [49].

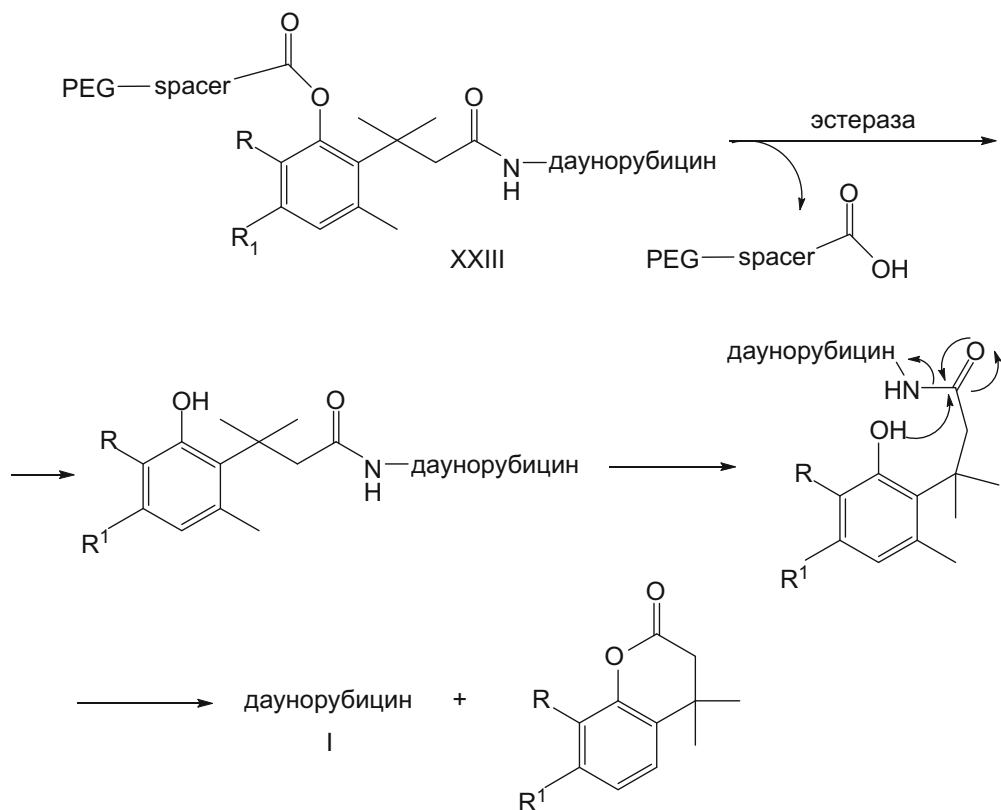
Конъюгаты антрациклиновых антибиотиков с альбумином

Описаны различные конъюгаты антрациклиновых антибиотиков альбуминами. Так, конъюгат I с бычьим сывороточным альбумином (БСА), полученный по схеме 1, демонстрировал повышенную антипролиферативную активность в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [50]. Конъюгат II с БСА, полученный по той же схеме, был активен в отношении опухолевых клеток АН66, устойчивых к I [51, 52].

Синтезированы конъюгаты I и II с человеческим сывороточным альбумином с использованием кислотоустойчивой (гидразон) или кислотоустойчивой (амид) связи между молекулой антибиотика и белком [53]. Конъюгаты со стабильной амидной связью утрачивали антипролиферативную активность, в то время как кислотоустойчивые конъюгаты проявляли цитотоксичность, сравнимую с цитотоксичностью исходных антибиотиков.

Серьезным недостатком производных альбумина является отсутствие механизмов активного транспорта в клетку, поэтому недавно был предложен перспек-

Схема 5



Выделение свободного даунорубина из конъюгата с PEG [49].

тивный подход, заключающийся в получении конъюгатов II с альбумином через лабильную дисульфидную связь, при этом молекула альбумина дополнительно несет фрагменты пептидов, проникающих в клетку (СРР) [54]. Такие конъюгаты демонстрировали повышенную способность проникать в опухолевые клетки и сниженную токсичность в экспериментах *in vivo*.

Другим минусом подхода, основанного на получении конъюгатов антрациклинов с альбумином, является способность этих антибиотиков и их производных образовывать прочные неспецифические (нековалентные) комплексы [55, 56].

Таким образом, можно заключить, что стратегия поиска новых противоопухолевых агентов на основе конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с макромолекулами является перспективным и актуальным направлением современных исследований в области медицинской химии. Получение конъюгатов антрациклинов с макромолекулами коренным образом изменяет фармакокинетические характеристики противоопухолевого агента, поскольку абсорбция и распределение препарата в организме определяются уже физико-химическими свойствами макромолекулы, а не цитостатика. Этот подход может быть эффективен для направленной доставки препарата, улучшения терапевтического индекса и, в ряде случаев, для преодоления резистентности опухолевых клеток.

Преимущества перед исходными противоопухолевыми антибиотиками демонстрируют те конъюгаты, молекула которых способна проникать в опухолевую

клетку (путем активного транспорта или эндоцитоза). В подавляющем большинстве случаев оправдано введение спейсера между молекулой цитостатика и макромолекулой, при этом конъюгаты, содержащие расщепляемый спейсер, демонстрируют более высокую активность по сравнению с конъюгатами, содержащими стабильный нерасщепляемый спейсер.

Определенным недостатком использования макромолекул в качестве “переносчиков” для лекарственных препаратов, является то, что при парентеральном введении возможно возникновение иммунного ответа, а при введении *per os* макромолекулы, как правило, не усваиваются. Другими проблемами являются сложность синтеза и высокая себестоимость получающихся препаратов. Кроме того, при дизайне структур конъюгатов антрациклиновых антибиотиков с макромолекулами необходимо учитывать возможность образования нековалентных (неспецифических) и молекулярных комплексов антрациклинов с полимерами, белками, полисахаридами [55 – 57].

Тем не менее обсуждаемый подход уже привел к препаратам, проходящим клинические испытания (XV, XVII, XIX); исследования в этой области, несомненно, будут продолжены.

Автор выражает глубочайшую признательность профессору, д.х.н. Преображенской М. Н. и профессору, д.х.н. Олсуфьевой Е. Н. за плодотворное обсуждение обзора и критические замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. F. Arcamone, *Doxorubicin anticancer antibiotics*, Academic Press, New York (1981).
2. El H. S. Khadem, *Anthracycline antibiotics*, Academic Press, New York (1982).
3. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система), выпуск XV, Эхо, Москва (2014).
4. D. Dal Ben, M. Palumbo, G. Zagotto, et al., *Cur. Pharm. Des.*, **13**, 2766 – 2780 (2007).
5. Л. Г. Деженкова, В. Б. Цветков, А. А. Штиль, *Успехи химии*, **83**, 82 – 94 (2014).
6. B. Pfeffer, *Brit. J. Cardiology*, **16**, 85 – 89 (2009).
7. M. N. Preobrazhenskaya, A. N. Tevyashova, E. N. Olsufyeva, et al., *J. Med. Sci.*, **26**, 119 – 128 (2006).
8. F. Hudecz, J. Remenyi, R. Szabo, et al., *J. Mol. Recognit.*, **16**, 288 – 298 (2003).
9. E. Damen, F. de Groot, H. Scheeren, *Expert Op. Therap. Patents*, **11**, 651 – 666 (2001).
10. E. Koivunen, B. Wang, E. Ruoslahti, *Biotechnology*, **13**, 265 – 270 (1995).
11. F. J. Burrows and P. E. Thorpe, *Pharm. Ther.*, **64**, 155 – 174 (1994).
12. R. Pasqualini, E. Koivunen, R. Kain, et al., *Can. Res.*, **60**, 722 – 727 (2000).
13. W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, *Science*, **279**, 377 – 380 (1998).
14. A. V. Schally, N. Nagy, *Eur. J. Endocrin.*, **141**, 1 – 14 (1999).
15. Z. Kahan, A. Nagy, A. V. Schally, et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, **59**, 255 – 262 (2000).
16. L. J. Krebs, X. Wang, H. E. Pudavar, et al., *Cancer Res.*, **60**, 4194 – 4199 (2000).
17. H. Kiaris, A. V. Schally, A. Nagy, et al., *Br. J. Cancer*, **81**, 966 – 971 (1999).
18. A. Nagy, A. V. Schally, S. Halmos, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 794 – 799 (1998).
19. Г. Ф. Гаузе, Ю. В. Дудник, *Противоопухолевые антибиотики*, Медицина, Москва (1987).
20. E. Dupont, A. Prochiantz, A. Joliot, *Methods Mol. Biol.*, **683**, 21 – 29 (2011).
21. J. F. Liang, V. C. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **15**, 5071 – 5075 (2005).
22. H. Mizutani, S. Tada-Oikawa, Y. Hiraku, et al., *Life Sci.*, **76**, 1439 – 1453 (2005).
23. M. Mazel, P. Clair, C. Rousselle, et al., *Anticancer Drugs*, **12**, 107 – 116 (2001).
24. M. Langer, F. Kratz, B. Rothen-Rutishauser, et al., *J. Med. Chem.*, **44**, 1341 – 1348 (2001).
25. S. V. Lutsenko, N. B. Feldman, S. E. Severin, *J. Drug Target*, **10**, 567 – 571 (2002).
26. M. Fritzer, T. Szekeres, V. Szüts, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 489 – 493 (1996).
27. D. Łubgan, Z. Józwiak, G. Grabenbauer, et al., *Cell. Mol. Biol. Let.*, **14**, 113 – 127 (2009).
28. Vogel Carl-Wilhelm (ed.), *Immunoconjugates: Antibody conjugates in radioimaging and therapy of cancer*, Oxford University Press, Oxford (1987).
29. N. B. Feldman, S. M., Kiselev, N. V. Gusakova, *Biochemistry*, **65**, 967 – 971 (2000).
30. G. L. Griffiths, M. J. Mattes, R. Stein, et al., *Clin. Cancer Res.*, **9**, 6567 – 6571 (2003).
31. P. Sapra, R. Stein, J. Pickett, et al., *Clin. Cancer Res.*, **11**, 5257 – 5264 (2005).
32. A. T. Pamela, *Antibodies*, **2**, 113 – 129 (2013).
33. A. A. Klyosov, Z. J. Witezak, D. Platt (eds.), *Carbohydrates and Drug Design*, Oxford University Press, Washington (2006).
34. A. A. Klyosov (ed.), *Glycobiology and Drug Design*, Oxford University Press, Washington (2012).
35. А. Н. Тевяшова, Е. Н. Олсуфьева, М. Н. Преображенская, *Биоорган. химия*, **33**, 148 – 155 (2007).
36. T. Minko, P. Kopecková, V. Pozharov, et al., *J. Control. Rel.*, **54**, 223 – 233 (1998).
37. J. Kopecek, P. Kopecková, T. Minko, et al., *Eur. J. Pharm. Biopharma*, **50**, 61 – 81 (2000).
38. J. Kopecek and P. Kopecková, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 122 – 149 (2010).
39. R. Duncan, *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 56 – 60 (2007).
40. M. Sirova, T. Mrkvan, T. Etrych, et al., *Pharm. Res.*, **27**, 200 – 208 (2010).
41. T. Minko, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 192 – 202 (2010).
42. B. Rihová and M. Kovár, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **62**, 184 – 191 (2010).
43. C. Monneret, *Eur. J. Med. Chem.*, **36**, 483 – 493 (2001).
44. C. Li and S. Wallace, *Adv. Drug Del. Rev.*, **60**, 886 – 898 (2008).
45. B. Rihova, T. Etrych, M. Pechar, et al., *J. Control Rel.*, **74**, 225 – 232 (2001).
46. D. Kopeckova, T. Minko, A. Rubinstein, et al., *Eur. J. Cancer*, **40**, 148 – 157 (2004).
47. L. W. Seymour, D. R. Ferry, D. Anderson, et al., *J. Clin. Oncol.*, **20**, 1668 – 1676 (2002).
48. M. Jelinkova, J. Storhaln, T. Etrych, et al., *Pharm. Res.*, **20**, 1558 – 1564 (2003).
49. R. Silverman, *Organic chemistry of drug design and drug action*, Elsevier Academic Press, San Diego (2004).
50. J. Laguex, M. Page, F. Delorme, *Semin. Oncol.*, **11**, 59063 (1984).
51. K. Ohkawa, T. Hatano, Y. Tsukuda, et al., *Br. J. Cancer*, **67**, 274 – 278 (1993).
52. K. Ohkawa, T. Hatano, K. Yamada, et al., *Cancer Res.*, **53**, 4238 – 4242 (1993).
53. F. Kratz, U. Beyer, T. Roth, et al., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 338 – 346 (1998).
54. Q. Guo, H. Wang, Y. Zhao, et al., *Polym. Chem.*, **4**, 4584 – 4587 (2013).
55. М. И. Резникова, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Москва (1989).
56. D. Agudelo, P. Bourassa, J. Bruneau, et al., *PLOS ONE*, **7**, e43814 (2012).
57. Л. А. Яковишин, В. И. Гришковец, А. В. Клименко и др., *Хим.-фарм. журн.*, **48**(6), 37 – 40 (2014); *Pharm. Chem. J.*, **48**(6), 391 – 394 (2014).

Поступила 06.11.14

CONJUGATES OF ANTHRACYCLINE ANTIBIOTICS WITH MACROMOLECULES

A. N. Tevyashova

Gauze Institute of New Antibiotics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 119021 Russia;
e-mail: chulis@mail.ru

Recent achievements in the synthesis of anthracycline antibiotics conjugated with macromolecules are reviewed. The conjugates are classified depending on the size of macromolecule and presence or absence of structural elements responsible for the selective binding (interaction) with certain components of cell membrane or cytoplasm.

Keywords: anthracycline antibiotics; doxorubicin; daunorubicin; macromolecules; conjugates; antiproliferative activity; antitumor activity; monoclonal antibodies; angiogenic tumor growth factors.