

УДК 615.277.3

РАЗРАБОТКА СИСТЕМ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ АКТИНОМИЦИНОВОГО РЯДА С РЕКОМБИНАНТНЫМ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕИНОМ

© 2017 г. Е. Д. Никольская^{1,*}, О. А. Жунина¹, Н. Г. Яббаров¹,
академик РАН В. И. Швец², Б. И. Круглый¹,
член-корреспондент РАН Е. С. Северин¹

Поступило 08.11.2016 г.

В дрожжевой системе *P. pastoris* получен рекомбинантный альфа-фетопротеина (рАФП) и подтверждена его функциональная активность. Разработан способ получения полимерных частиц, содержащих дактиномицин, и осуществлён синтез конъюгата с рАФП на их основе. Была показана эффективность полученного конъюгата в отношении опухолевых клеток линий HeLa, SKOV3 и MG-63, а также отсутствие токсичности в отношении нормальных клеток. В экспериментах на животных зарегистрировали значительное увеличение противоопухолевой эффективности конъюгата при снижении общей токсичности при сравнении с коммерческим препаратом дактиномицина.

DOI: 10.7868/S0869565217120258

Одним из наиболее перспективных направлений современной онкологии является принцип векторной адресной доставки цитостатических агентов в опухолевые клетки. Увеличение селективности противоопухолевых препаратов (ПП) достигается путем создания систем направленного транспорта с векторной молекулой – альфа-фетопротеином (АФП) [1–3]. Ранее [4] нами было доказано наличие на поверхности опухолевых клеток рецепторов к АФП (РАФП) и полное отсутствие их экспрессии на поверхности нормальных клеток. Эффективность создания “таргетных” систем была подтверждена на примере дактиномицина (ДМ), паклитаксела, доксорубина и др., а также их полимерных форм с рекомбинантным третьим доменом АФП (рЗдАФП), полученным в системе *E. coli* [5], и полноразмерным АФП, проникающих в опухолевые клетки по механизму рецепторопосредованного эндоцитоза [6, 7].

Целью нашей работы явилось создание нового ПП белково-векторной доставки, включающего разработку метода получения рекомбинантного

АФП (рАФП) в дрожжевой системе экспрессии *P. pastoris* и его конъюгатов с ДМ в полимерных частицах (ПЧ) на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), а также изучение их противоопухолевой эффективности *in vitro* и *in vivo*.

Полимерные частицы получали с помощью разработанного нами метода нанопреципитации. В качестве полимерной матрицы использовали PLGA-СООН в отношении 50/50. Очистку проводили на носителе Superose 6 (“GE Healthcare Life Sciences”, США). Средний диаметр полученных частиц составлял 100–120 нм, эффективность включения ДМ – 62%. Полученные частицы далее конъюгировали с рАФП.

Получение рАФП проводили в *P. pastoris*. Очистку и выделение рАФП осуществляли с помощью аффинной хроматографии (BrCN-Sephарозе, антитела 4а3), достигая чистоты конечного продукта 95% (по электрофорезу и иммуноблоттингу). Контроль всех стадий осуществляли двухстадийным “сэндвич”-методом иммуноферментного анализа.

Сравнение функциональной активности рАФП с нативным АФП проводили на клетках аденокарциномы молочной железы линии MCF-7. Производные белков, меченных флуоресцеином, инкубировали с клетками и определяли интенсивность флуоресценции методом

¹ Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

² Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий)

*E-mail: elenanikolskaja@gmail.com

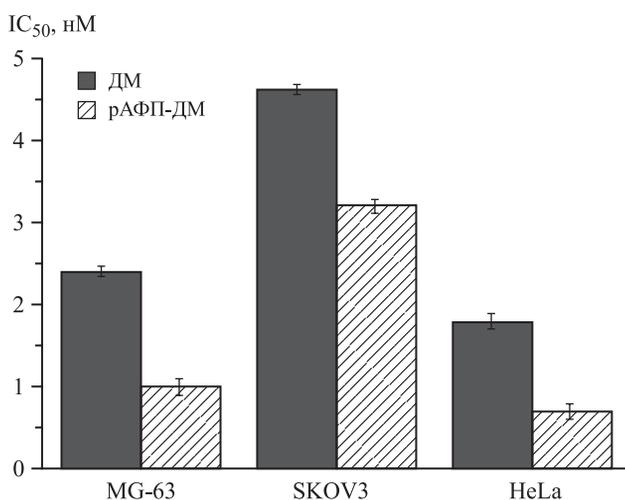


Рис. 1. Значение IC_{50} (концентрация препарата, при которой наблюдается гибель 50% клеток, нМ) для клеток карциномы шейки матки человека линии HeLa, аденокарциномы человека линии SKOV3, остеосаркомы человека линии MG-63 после 72 ч инкубации с ДМ и конъюгатом рАФП-ДМ. $M \pm SD, n = 3$.

проточной цитофлуориметрии. Полученные данные показали идентичные профили кривых нативного АФП и рАФП при +4 и при +37 °С, что подтверждает наличие функциональной активности рАФП, аналогичной нативному белку.

При взаимодействии гидрофобного участка во втором домене рАФП с циклическими пентапептидными фрагментами ДМ был получен конъюгат рАФП с ДМ (рАФП-ДМ). Противоопухолевую цитотоксичность рАФП-ДМ подтверждали на клетках карциномы шейки матки человека линии HeLa, аденокарциномы человека линии SKOV3 и остеосаркомы человека линии MG-63 после 72 ч инкубации (рис. 1). На лимфоциты периферической крови человека рАФП-ДМ практически не оказывал токсического действия в отличие от ДМ (рис. 2).

Получение конъюгата ПЧ, содержащих ДМ, с рАФП проводили в фосфатно-солевом буфере в течение 1 ч с использованием водорастворимого карбодиимида (образование амидной связи происходило между PLGA-COOH отмытых частиц и аминогруппой рАФП). Полученный конъюгат (“Афотид”) очищали на смоле Superose 12 с полным разделением продуктов реакции и выходом 90%.

Цитотоксичность в отношении клеток линий HeLa, SKOV3 и MG-63 для препарата “Афотид” была в 2,5 раза больше, чем у ДМ, и мы наблюдали минимальную токсичность “Афотида” в отношении лимфоцитов человека. Использование ПЧ обеспечивало большую концентрацию ДМ и его пролонгированное действие, что способствовало снижению кратности приема и общей токсичности препарата.

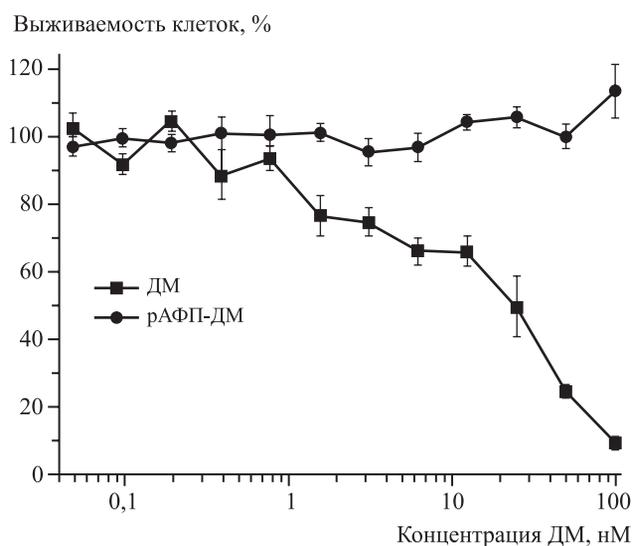


Рис. 2. Выживаемость лимфоцитов периферической крови человека после инкубации с ДМ и конъюгатом рАФП-ДМ в течение 1 ч. $M \pm SD, n = 3$.

Подтверждением этого являются значения LD_{50} : для “Афотида” – 1,580 мг/кг, для коммерческого препарата сравнения “Акномид Д” – 0,601 мг/кг. По этим значениям LD_{50} можно свидетельствовать о снижении общей токсичности более чем в 2 раза.

Противоопухолевое действие “Афотида” определяли на мышах линии DBA/2J на модели перевиваемого лимфолейкоза P388. Препараты вводили 10 раз через 24 ч после перевивки опухоли в дозах 50, 100, 150 и 200 мкг/кг 1 раз в сут. На рис. 3 показаны размеры опухолей после окончания курса лечения. Мы зарегистрировали дозозависимый характер противоопухолевого действия препарата “Афотид”, а также 100%-е торможение роста опухоли (ТРО) в группе с дозой 200 мкг/кг.

Пролонгированное действие препарата “Афотид” определяли в эксперименте с применением разных курсов лечения. Конъюгат и препарат сравнения “Акномид Д” вводили в дозах 85,0 мкг/кг каждые 48 ч по 3, 5 или 7 инъекций. На рис. 4 показано увеличение продолжительности жизни (УПЖ) животных в сравнении с нелеченым контролем. При 7-кратном введении препарата “Афотид” наблюдали УПЖ до 154% (у препарата сравнения УПЖ 77%). Значение ТРО составило 83,2%, в то время как для “Акномид Д” – 62,7%.

Полученные в нашей работе данные подтверждают противоопухолевую эффективность препарата “Афотид”, а также наличие его пролонгированного действия при незначительной общей токсичности.

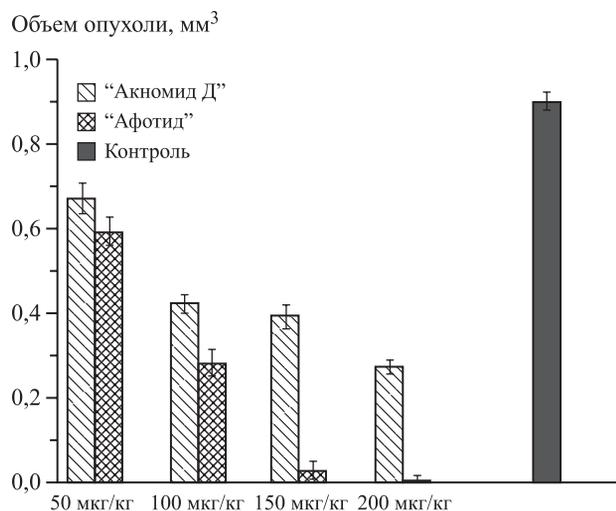


Рис. 3. Сравнительная характеристика противоопухолевого действия препаратов "Афотид" и "Акномид Д" у мышей линии DBA/2J с привитым лимфолейкозом P388 в группах с дозами 50, 100, 150 и 200 мкг/кг при регистрации через 11 дней после инокуляции опухолевых клеток. $M \pm SD$, $n = 10$.

Предлагаемый подход в получении конъюгатов ПЧ, содержащих ПП, с рАФП имеет все шансы стать ведущим для синтеза малотоксичных цитостатических препаратов. Разработанная технология в будущем позволит широко использовать этот способ "таргетной" терапии для лечения разных видов злокачественных новообразований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Severin S.E., Moskaleva E.Yu., Shmyrev I.I., et al. // Biochem. and Mol. Biol. Int. 1995. V. 37. № 2. P. 385–392.
2. Северин Е.С. // Успехи химии. 2015. Т. 84. № 1. С. 43–60.

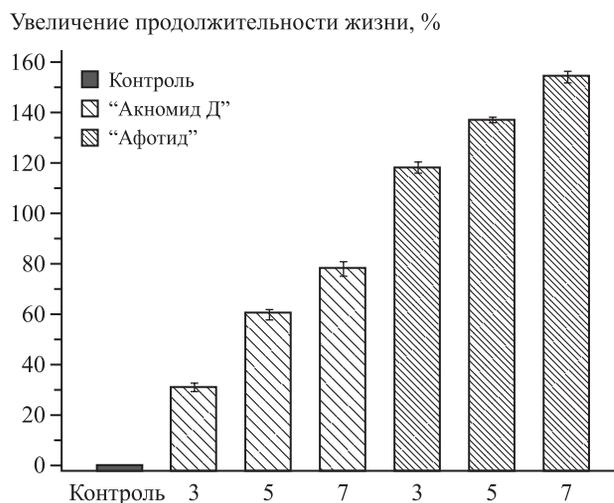


Рис. 4. Увеличение средней продолжительности жизни мышей линии DBA/2J с привитой солидной опухолью (лимфолейкоз P388) после лечения препаратами "Акномид Д" и "Афотид" в зависимости от курса лечения. По оси абсцисс 3, 5, 7 – число инъекций препаратов. $M \pm SD$, $n = 10$.

3. Северин Е.С., Круглый Б.И., Северин С.Е. // Аллергология и иммунология. 2015. Т. 16. № 4. С. 347–350.
4. Ницетов М.Б., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А. и др. // Иммунология. 2005. № 2. С. 122–125.
5. Posypanova G.A., Gorokhovets N.V., Makarov V.A., et al. // J. Drug. Target. 2008. V. 16. № 4. P. 321–328.
6. Годованный А.В., Саватеева М.В., Сотниченко А.И. и др. // Молекуляр. медицина. 2011. № 1. С. 44–48.
7. Круглый Б.И., Никольская Е.Д., Северин Е.С. и др. // Онкопедиатрия. 2016. Т. 3. № 3. С. 188–199

DOI: 10.15690/onco.v3i3.1597

**Б.И. Круглый², Е.Д. Никольская¹, Е.С. Северин¹, Г.Г. Барсегян¹, Н.Г. Яббаров¹,
О.Г. Терещенко², О.А. Жунина¹, В.А. Зенин², А.И. Тюляев³**¹ Открытое акционерное общество «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения», Москва, Российская Федерация² Общество с ограниченной ответственностью «Лаборатория инновационных научных исследований в медицине», Москва, Российская Федерация³ Общество с ограниченной ответственностью «АдиКом», Москва, Российская Федерация

Сравнительные исследования противоопухолевой активности и безопасности нового препарата белково- векторной доставки актиномицинового ряда на экспериментальных опухолевых моделях у мышей

188

Актуальность. Исследованы острая токсичность и противоопухолевое действие нового препарата белково-векторной доставки. Действующим цитостатическим агентом является противоопухолевый антибиотик дактиномицин, инкапсулированный в полимерную PLGA-нанокapsулу, а белковым вектором — рекомбинантный альфа-фетопротеин. **Целью** исследования является сравнительное изучение токсичности и противоопухолевой активности нового препарата и прототипа на экспериментальных опухолевых моделях у мышей.

Материалы и методы. Исследование эффективности препарата проводили на 90 самках беспородных мышей с асцитной моделью аденокарциномы Эрлиха и 140 мышей-самок DBA/2 с моделью лимфолейкоза P388. Производилась токсикометрия с определением выживаемости мышей при введении возрастающих доз по Литчфилду–Уилкоксоу. Противоопухолевое действие препаратов определялось путем расчета торможения роста опухоли и удлинения продолжительности жизни. **Результаты.** Препарат белково-векторной доставки обладает отчетливо меньшей токсичностью, при этом выявлен феномен значительного снижения ее у мышей с моделированной опухолью по сравнению со здоровыми животными. Показатель ЛД₅₀ возрастал до 1,580 против 0,601 мг/кг для прототипа у здоровых животных. Такой феномен кардинально расширяет возможности для проведения лекарственной терапии новым препаратом с применением относительно более высоких разовых и курсовых доз, что приводит к повышению его клинической эффективности при существенном снижении частоты и выраженности побочных действий. Отмечается достоверно более высокий уровень (в 4,6 раз; $p < 0,0001$) накопления 7-амино-дактиномицина (7-АД) в опухолевых клетках при включении его в наночастицы, конъюгированные с альфа-фетопротеином, по сравнению с 7-АД, инкапсулированным в наночастицы и чистой субстанцией 7-АД при внутрибрюшинном введении мышам с асцитной карциномой Эрлиха. Отмечается существенное повышение противоопухолевого эффекта препарата белково-векторной доставки по сравнению с прототипом по критериям торможения роста опухоли, у чувствительной к дактиномицину модели в 1,48 раза, у резистентной модели — в 2,32 раза. По критерию увеличения продолжительности жизни — в 2,71 и 3,525 соответственно. **Заключение.** Использование препарата белково-векторной доставки актиномицинового ряда у мышей с моделированными опухолями приводит к значительному повышению противоопухолевой эффективности и безопасности по сравнению с прототипом.

Ключевые слова: белково-векторная доставка, дактиномицин, противоопухолевая активность, острая токсичность.

(Для цитирования): Круглый Б.И., Никольская Е.Д., Северин Е.С., Барсегян Г.Г., Яббаров Н.Г., Терещенко О.Г., Жунина О.А., Зенин В.А., Тюляев А.И. Сравнительные исследования противоопухолевой активности и безопасности нового препарата белково-векторной доставки актиномицинового ряда на экспериментальных опухолевых моделях у мышей. *Онкопедиатрия*. 2016; 3(3): 188–199. Doi: 10.15690/onco.v3i3.1597

АКТУАЛЬНОСТЬ

Одной из основных сторон современной фармакологии является направленный транспорт лекарственных препаратов к специфическим локусам организма человека. Преимуществом «адресной»

доставки препарата к опухолевым клеткам-мишеням в сравнении с пассивной диффузией является снижение лекарственной нагрузки на организм пациента в виде уменьшения дозы препарата без потери ее эффективности.

Требования к макромолекулам препаратов белково-векторной доставки

Принципиальным для данного подхода является создание химически или биологически сконструированных макромолекул, состоящих из векторной и неспецифической частей, содержащих противоопухолевый лекарственный препарат [1–3]. В качестве векторной части должны использоваться молекулы, обладающие специфическим сродством к рецепторам клеток-мишеней: например, моноклональные антитела, специфичные к тому или иному антигену на поверхности клетки-мишени [4]. Неизбежным недостатком иммуноконъюгатов является возможность провоцирования иммунного ответа на сам препарат; быстрая приспособляемость опухолевых клеток, приводящая к изменчивости и модификации целевых тканеспецифичных антигенов. Кроме того, для достижения

клинического эффекта существует необходимость одновременного применения нескольких цитостатических препаратов с высокой токсичностью.

Существует другой класс биологических макромолекул, высокоспецифичных для опухолевых клеток, так называемые онкофетальные белки, которые не являются чужеродными для человеческого организма, и рецепторы к ним присутствуют преимущественно на опухолевых клетках. К этой группе белков относится альфа-фетопротеин (АФП) [5].

Дактиномицин

В настоящее время в клинической онкологии используется достаточно большое количество (более 60) химиопрепаратов антинеопластического действия. В качестве цитостатического агента неспецифической части препарата белково-векторной доставки нами был выбран противоопу-

**B.I. Kruglyi², E.D. Nikolskaya¹, E.S. Severin¹, G.G. Barsegyan¹, N.G. Yabbarov¹,
O.G. Tereshchenko², O.A. Zhunina¹, V.A. Zenin², A.I. Tyulyaev³**

¹ Russian Research Center of Molecular Diagnostics and Therapy, OJSC, Moscow, Russian Federation

² The Laboratory of Innovative Studies in Medicine, LTD, Moscow, Russian Federation.

³ «Adicom», LTD, Moscow, Russian Federation

189

The Comparative Study of Antitumor Activity and Safety of the Novel Protein-targeted Actinomycin Drugs Delivery in Experimental Tumor Models of Mice

Introduction. The possible acute toxicity and antitumor activity of the novel protein-targeted delivery drug — «Afortid» — was investigated. The biodegradable PLGA nanoparticles were loaded by active cytostatic agent and then conjugated with AFP. **Objective.** Main research objectives are the precise determination of toxicity levels and study of anti-neoplastic activity of the drug synthesized on ascites and solid in vivo tumor models. **Materials and Methods.** Ehrlich ascites carcinoma (EAC) model was developed in 90 outbred female mice, and Lymphocytic leukemia P388 solid tumor model — in 140 female DBA/2 mice. The toxicometry with survival rate of mice was estimated by escalation the dosing according to J.T. Litchfield and F. Wilcoxon method. The antitumor activity was estimated by the indexes of tumor growth inhibition (TGI) and average lifespan (ALS). **Results.** The targeted drug delivery is significantly less toxic than the prototype. The phenomenon of substantial decrease of toxic effects in mice with tumor model equalized to healthy animals was detected. LD50 increased up to 1.580 mg/kg for dactinomycin vs 0.601 mg/kg for prototype in healthy mice. This is critically upscale potentialities for clinical use of protein-targeted drug delivery of «Afortid» in therapy with higher single and course doses which results in the significant increase of antitumor activity and decrease of toxic side effects. 7-aminoactinomycin D (7-AAD) loaded nanoparticles bearing AFP showed substantially higher accumulation (4.5 fold $p < 0.0001$) in tumor cells after intraperitoneal injection to EAC mice compared to prototype compound. The antitumor effect of protein-targeted delivery drug in comparison with prototype is significantly higher. The effect based on TGI criteria for «Afortid» is 1.48 fold higher in dactinomycin-vulnerable lymphocytic leukemia P388 model and 2.32 fold higher for dactinomycin-resistant lymphocytic leukemia P388 model. According to ALS criteria, the increasing rates are 2.71 fold and 3.525 fold higher respectively. **Conclusion.** The novel protein-targeted drug delivery has significantly higher antitumor activity and lower toxicity as compared with the prototype.

Keywords: protein-targeted delivery, dactinomycin, antitumor activity, acute toxicity.

(For citation: Kruglyi B.I., Nikolskaya E.D., Severin E.S., Barsegyan G.G., Yabbarov N.G., Tereshchenko O.G., Zhunina O.A., Zenin V.A., Tyulyaev A.I. The Comparative Study of Antitumor Activity and Safety of the Novel Protein-targeted Actinomycin Drugs Delivery in Experimental Tumor Models of Mice. *Onkopediatria*. 2016; 3(3): 188–199. Doi: 10.15690/onco.v3i3.1597)

холевый антибиотик актиномицин D (дактиномицин), который является как одним из наиболее эффективных, так и наиболее токсичным антинеопластическим средством [6–8]. Механизм цитотоксического действия актиномицинов и других антрациклиновых противоопухолевых антибиотиков обусловлен главным образом ингибированием синтеза нуклеиновых кислот посредством интеркаляции между парами азотистых оснований, а также нарушением процесса вторичной спирализации ДНК за счет взаимодействия с макромолекулой топоизомеразы II [9]. Все это обуславливает высокую антимиотическую активность на фоне низкой избирательности действия. Многочисленные клинические исследования продемонстрировали эффективность дактиномицина в терапии опухоли Вильмса и рабдомиосаркомы, хориокарциномы и саркомы матки, саркомы Юинга, мягких тканей, злокачественных лимфом, герминогенных опухолей яичка и яичников, меланобластом, ангиосаркомы Капоши. В большинстве случаев для повышения эффективности лечения препарат используется в комбинации с другими цитостатическими средствами: наиболее часто с метотрексатом, винкристином, циклофосфаном, а также с лучевой терапией. За счет индивидуального подбора комбинации препаратов для химиотерапии удается повысить эффективность лечения злокачественных новообразований, для которых монокомпонентная терапия дактиномицином или другим цитостатическим препаратом ранее имела низкий показатель ремиссий [6, 7].

На текущий момент дактиномицин является орфанным препаратом, его широкое распространение ограничивается высокой токсичностью и малым терапевтическим диапазоном. С момента его открытия не прекращаются попытки снизить токсичность молекулы с помощью химических модификаций и разработки новых лекарственных форм. Снижение токсичности дактиномицина путем повышения селективности его действия должно привести, во-первых, к быстрому выведению препарата из кровотока больного и накоплению его в опухолевой ткани, а во-вторых, — к существенному снижению эффективной дозы.

В промышленных масштабах дактиномицин получают биосинтетическим путем. Наличие штамма-продуцента, выделяющего преимущественно актиномицин D в смеси актиномицинов, требует дальнейшей очистки препарата от структурно сходных примесей [10]. Важным аргументом для выбора именно дактиномицина в качестве цитостатического агента является и факт доступности высококачественной субстанции отечественного производства (ОАО «ОНОПБ», Россия). Исследование физико-химических свойств данной субстанции методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектропии, корреляционной спектроскопии ядерного магнитного резонанса, спектрофлуориметрии, а

также подтверждение цитотоксической активности продемонстрировали полное совпадение со стандартом. Таким образом, можно сделать вывод, что отечественная субстанция дактиномицина является высокоочищенным препаратом и показывает присущую ему фармакологическую активность *in vitro* [11].

Сравнительное клиническое изучение препаратов «Акномид Д» (ООО «Адиком», Россия), разработанного на основе этой субстанции, и Космеген (H. Lundbeck A/S, Великобритания) у детей с нефробластомой продемонстрировало идентичную терапевтическую эффективность и достоверно более низкую подострую гепатотоксичность первого [6, 7].

Компоненты векторной доставки

Мишенью для направленного транспорта являются рецепторы АФП, а в качестве вектора предлагается использовать рекомбинантный гликопротеин [12–14]. Преимущества использования именно АФП, а не других транспортных белков (например, альбумина, трансферрина или эпидермального фактора роста), объясняются тем, что он относится к физиологическим транспортным белкам и осуществляет доставку жирных кислот в живые клетки для поддержания их жизнедеятельности, при этом хорошо известен факт экспрессии опухолевыми клетками рецепторов АФП и их полное отсутствие в здоровых клетках человека [1–3, 12–22].

Экспрессия рецепторов АФП была показана на нескольких типах опухолей в различных моделях, таких как рабдомиосаркома крысы [23], нейробластома мыши [24], карцинома молочной железы мыши и человека [23, 25], Т-лимфома мыши [26], лимфома Т- и С-клеток человека [23], линия моноцитных клеток злокачественного новообразования U937 [27], линия клеток рака толстой кишки человека HT29 [23] и др. Эти данные характеризуют АФП как широко распространенный карциноэмбриональный антиген — специфичный маркер злокачественной опухоли.

Важным компонентом препаратов векторной доставки являются наночастицы на основе биоразлагаемых полилактидгликолидов (Polylactic-Co-Glycolic Acid, PLGA), которые наиболее часто используются для этих целей [28–31]. Полилактидгликолиды можно получить синтетическим путем — из молочной и гликолевой кислот, образующих между собой сложноэфирную связь. Физико-химические свойства PLGA определяются молярным соотношением и последовательным расположением молочной и гликолевых кислот.

Наносители этого типа особенно эффективны для внутриклеточной доставки лекарственных веществ [28, 31–33]. При такой контролируемой доставке обеспечивается интактность терапевтического агента до взаимодействия с целевы-

ми мишенями, предотвращается преждевременная деградация вещества, что позволяет снизить общетоксическое действие препарата [28, 31, 33]. Парентеральное применение наночастиц связано в основном с терапией опухолевых заболеваний [28, 29, 31, 33]. Размер коллоидных наноносителей (в исследуемом препарате — 110 ± 28 нм) в среднем в 64 раза меньше диаметра эритроцитов ($\sim 7,0$ мкм), следовательно, они могут быть введены внутривенно без какого-либо риска эмболии. Попадая в кровяное русло, наночастицы циркулируют в нем до момента достижения ими зоны поражения и не выходят за пределы капилляров в здоровых тканях [31]. Наличие химически конъюгированного АФП с поверхностью полимерных частиц обуславливает взаимодействие конъюгата со специфическими АФП-аффинными рецепторами опухолевых клеток и дальнейший рецепторопосредованный эндоцитоз наночастиц, содержащих противоопухолевый препарат. Таким образом, осуществляется «адресная» доставка в опухолевую ткань, что приводит к значительному снижению эффективной дозы препарата и токсического воздействия цитостатического агента [33]. Сами же наночастицы не обладают какими-либо токсичными свойствами [28, 29, 31, 33]; известны лекарственные препараты на их основе, разрешенные для клинического применения, в том числе парентеральным способом [3, 33].

Таким образом, была сконструирована молекула препарата белково-векторной доставки «Афотид»¹, в которой действующим цитостатическим агентом является дактиномицин, инкапсулированный в полимерную PLGA-нанокапсулу, а белковым вектором — рекомбинантный АФП (рис. 1) [2].

Целью настоящего исследования является сравнительное изучение противоопухолевой активности препарата белково-векторной доставки дактиномицина с прототипом на экспериментальных опухолевых моделях у мышей.

Задачи исследования

1. Сравнение общетоксического действия препарата белково-векторной доставки (препарат

1 Препарат находится в процессе Государственной регистрации в качестве лекарственного средства для медицинского применения.

выбора) с прототипом (препарат сравнения) у мышей с асцитной моделью аденокарциномы Эрлиха (ААЭ).

2. Исследование накопления опухолевыми клетками 7-амино-дактиномицина (7-АД) при внутрибрюшинном введении субстанций 7-АД, нано-7-АД и конъюгата нано-7-АД с АФП (препарат выбора) на модели ААЭ, привитой беспородным мышам.
3. Сравнение противоопухолевой активности препарата белково-векторной доставки с прототипом у мышей с солидной моделью лимфолейкоза Р388, чувствительной к дактиномицину, и с асцитной моделью лимфолейкоза Р388, резистентной к действию дактиномицина (Р388/АСТ-D) у мышей-самок инбредной линии DBA/2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сравниваемые препараты

Для проведения исследования использовали препараты:

- «Акномид Д», раствор для внутривенного введения и перфузии 0,5 мг/мл, производство ЗАО «Брынцалов А» по заказу ООО «Адиком», серия 010515; регистрационный номер ЛП-002036;
- дактиномицин, субстанция-порошок, производство ОАО «Омутнинская НОПБ», серия 010316, годен до 03.2019;
- рекомбинантный альфа-фетопроtein (рАФП), субстанция-порошок для приготовления стерильных лекарственных форм, 1 г, производство ООО «НПК КЕМ», серия 011015, годен до 10.2018;
- «Афотид», лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения и перфузии 0,125 мг/мл, 5 ампул по 1 мл, производство ЗАО «ЭкоФармПлюс» по заказу ООО «Лина М», серия 010515, годен до 05.2018.

Технология инкапсуляции

Для производства препарата использовалась разработанная нами технология инкапсуляции дактиномицина в полимерные частицы: навеску 5 мг дактиномицина растворяли в 5 мл ацетона, перемешивая на магнитной мешалке (Variomag Multipoint, США). Затем в раствор добавляли 50 мг

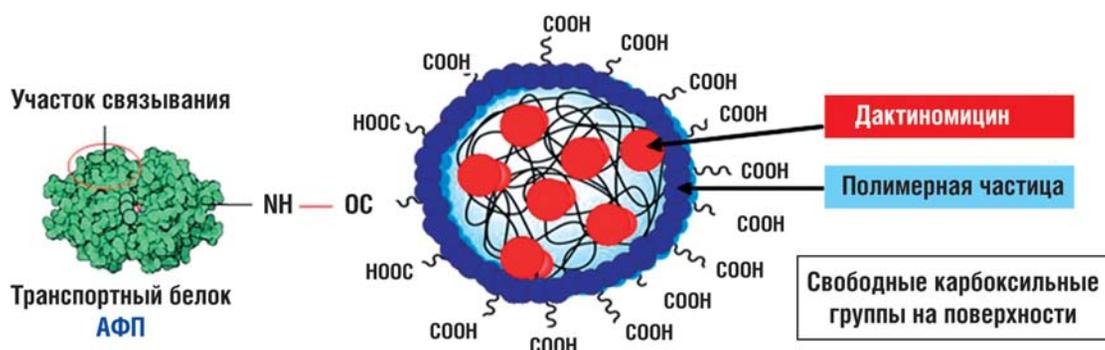


Рис. 1. Схематическое изображение сконструированной молекулы препарата белково-векторной доставки

Примечание. АФП — альфа-фетопроtein.

полимера PLGA50/50-COOH и перемешивали до полного растворения. С помощью инсулинового шприца при интенсивном перемешивании к 25 мл 0,5% поливинилового спирта добавляли дактиномицин и полимер в ацетоне. Перемешивали 30 мин. Далее удаляли органический растворитель на роторном испарителе Laborota 4000 Efficient (Германия) при вакууме 0,9–1 кгс/м² и температуре водяной бани 35°C. С целью удаления поливинилового спирта полученную смесь вращали на центрифуге J2–J21 (Beckman, США) в течение 20 мин при 14 000 об/мин. Полученный осадок отделяли от супернатанта и ресуспендировали на виброподвесе Vibrofix VF1 Electronic (IKA, ФРГ), предварительно добавив 5 мл дистиллированной воды. После этого смесь подвергали низкочастотной соникации на ультразвуковой бане Transsonic 420 (Elma, ФРГ) в течение 2 мин. Затем смесь пропускали через стеклянный фильтр (класс ПОР 40–110 мкм) в круглодонную колбу на 250 мл. Колбу с фильтратом дополнительно вакуумировали с помощью водоструйного насоса. К полученному раствору добавляли 100 мг криопротектора — Д-маннита — и замораживали в бане с жидким азотом. Колбу сушили на лиофильной сушке ALFA 1-5 (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, ФРГ) в течение 20 ч, после чего хранили при 4°C.

Технология получения препарата белково-векторной доставки

Использована следующая технология: 15 мг полимерных частиц, содержащих дактиномицин, суспендировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера (Phosphate-Buffered Saline, PBS), после чего к раствору добавляли 240 мкл 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC) и N-гидроксисукцинимид (N-hydroxysuccinimide, NHS) из стокового раствора в PBS с концентрацией 5 мг/мл и перемешивали 20 мин; затем добавляли 3 мкл β-меркаптоэтанола (β-mercaptoethanol, BME) и перемешивали еще 10 мин, после чего к реакционной массе добавляли 5 мг рекомбинантного АФП; полученную смесь перемешивали еще 30 мин. Для остановки реакции к полученному конъюгату добавляли 3 мкл этаноламина. Проводили гель-фильтрацию реакционной массы на сорбенте Superose 12 (GE Healthcare, США). Фракцию с целевым продуктом лиофилизировали на лиофильной сушке ALFA 1-5 в течение 20 ч, после чего хранили при -20°C.

Для исследования модели ААЭ использовали самки белых беспородных мышей в количестве 90 особей, модели лимфолейкоза P388 — мыши-самки породы DBA/2 в количестве 140 особей. Масса тела животных в начале исследования составила 18–20 г. Возраст на начало исследования — 8 нед; источник — питомник «Столбовая» НЦ биомедицинских технологий

РАМН (Московская обл.). Период акклиматизации — 14 сут. Содержимое ампул с раствором дактиномицина (500 мкг/мл) разводили 10% раствором реополиглукина до концентрации 12 мкг/1,0 мл и вводили мышам внутривенно в хвостовую вену по 0,2 мл.

Содержимое ампул с лиофилизатом конъюгата инкапсулированного в PLGA дактиномицина с АФП (0,125 мг/мл) растворяли в физиологическом растворе до концентрации 5,44 мкг/мл и вводили мышам внутривенно в хвостовую вену по 0,2 мл.

В качестве контроля использовали 10% раствор реополиглукина и физиологический раствор, которые вводили мышам внутривенно в хвостовую вену по 0,2 мл.

Изучение острого токсического действия препарата белково-векторной доставки дактиномицина и препарата сравнения на белых беспородных мышках-самках с ААЭ

Использовали клетки карциномы Эрлиха; источник культуры клеток — Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (Москва). Клетки хранили в жидком азоте. После размораживания их предварительно перевивали внутрибрюшинно 2–3 белым беспородным мышам. Для проведения экспериментов опухолевый материал в виде суспензии опухолевых клеток брали из асцитной жидкости. Подсчет жизнеспособных опухолевых клеток проводили в камере Горяева. Асцитную жидкость разводили в стерильном физиологическом растворе до концентрации 1×10^7 клеток/мл и перевивали белым беспородным мышам внутрибрюшинно. Для развития асцитной опухоли клетки АЭ перевивали белым беспородным мышам внутрибрюшинно путем введения суспензии клеток в дозе 1×10^6 клеток на особь, объем инъекции — 0,2 мл на особь. После перевивки опухолевых клеток животных рандомизировали, формировали экспериментальные группы и наносили индивидуальные метки насыщенным раствором пикриновой кислоты. Внутривенное введение проводили путем инъекции препарата одноразовым шприцем объемом 1 мл в латеральную хвостовую вену фиксированной мыши. Вводимый объем — 0,2 мл. Токсикометрия включала экспериментальное определение выживаемости мышей при введении возрастающих доз по Литчфилду–Уилкоксона, компьютерный расчет показателей острой токсичности — летальной дозы (ЛД₅₀, ЛД₁₆, ЛД₈₄), описание клинической картины интоксикации, вскрытие (некропсия) павших животных, а также животных, выживших и забитых через 30 дней после однократного введения препаратов, характеристику причин смертности.

Все подопытные животные были разделены на 8 групп. Группы формировались методом случайных чисел с использованием массы тела в качестве ведущего признака. Схема эксперимента приведена в табл. 1.

Таблица 1. Выживаемость белых беспородных мышей с асцитной карциномой Эрлиха в стандартном токсикологическом эксперименте

Группа	Препарат / введение	Пало	ЛД, мкг/кг
10 животных			
Контроль	По 0,2 мл 10% р-ра реополиглукина (в хвостовую вену) 1 раз через 5 дней после перевивки опухоли	0/10	—
I опытная	Через 5 дней после перевивки опухоли препаратом сравнения, внутривенное введение в дозе 850,0 мкг/кг в 0,2 мл 10% р-ра реополиглукина, однократное введение	10/10	ЛД ₁₀₀ — 852
II опытная	Через 5 дней после перевивки опухоли препаратом выбора, внутривенно в дозе 850,0 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра, однократное введение	0/10	—
III опытная	Через 5 дней после перевивки опухоли препаратом выбора, внутривенно в дозе 1050,0 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра, однократное введение	1/10	—
IV опытная	Через 5 дней после перевивки опухоли препаратом выбора, внутривенно в дозе 1300,0 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра, однократное введение	2/10	ЛД ₁₆ — 1264
V опытная	Через 5 дней после перевивки опухоли препаратом выбора, внутривенно в дозе 1550,0 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра, однократное введение	5/10	ЛД ₅₀ — 1580
VI опытная	Через 5 дней после перевивки опухоли препаратом выбора, внутривенно в дозе 1800,0 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра, однократное введение	7/10	ЛД ₈₄ — 1980
VII опытная	Через 5 дней после перевивки опухоли препаратом выбора, внутривенно в дозе 2050,0 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра, однократное введение	9/10	ЛД ₁₀₀ — 2100

Примечание. ЛД — летальная доза (16 / 50 — среднесмертельная, 84 / 100 — абсолютная смертельная). ЛД₅₀ для препарата сравнения составляет 0,601 мг/кг, для препарата выбора — 1,580 мг/кг.

Исследование накопления опухолевыми клетками 7-АД при внутрибрюшинном введении субстанции 7-АД, нано-7-АД и конъюгата нано-7-АД с АФП на модели ААЭ, привитой беспородным мышам

Двум беспородным мышам массой 20–25 г прививали внутрибрюшинно по 1 млн клеток ААЭ в 100 мкл среды для культивирования клеток (DMEM, Gibco, США). На 7–9-й день клетки образовавшейся асцитной опухоли перевивали аналогичным образом 12 беспородным мышам. Все подопытные животные были разделены на 4 группы. Группы формировались методом случайных чисел с использованием массы тела в качестве ведущего признака. На 7-й день животным вводили внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл препараты в дозе 400 мкг/кг в пересчете на содержание субстанции (7-АД):

- 1) контроль (физ. р-р);
- 2) 7-АД;
- 3) наночастицы с 7-АД;
- 4) конъюгат АФП с наночастицами, содержащими 7-АД (препарат выбора).

Через 4 ч производили отбор асцитной жидкости, опухолевые клетки отмывали холодным PBS 3 раза и фиксировали 4% параформальдегидом в течение 15 мин, затем 2 раза промывали холодным PBS. Каждый образец содержал не менее 200 тыс. клеток в 200 мкл буфера. Анализ

интернализации опухолевыми клетками 7-АД оценивали по интенсивности его флуоресценции на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (США): λ возбуждения — 488 нм, детекцию осуществляли при $\lambda = 647$ нм.

Изучение противоопухолевой активности препаратов сравнения на солидной модели лимфолейкоза P388 у мышей-самок линии DBA/2

Использовали следующие линии опухолевых клеток:

- 1) штамм лимфолейкоза мыши P388. Источник культуры клеток — Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (Москва). Клетки хранили в жидком азоте. Штамм поддерживается на мышах линии DBA/2. После разморозки клеток P388 суспензию предварительно перевивали внутрибрюшинно 2–3 мышам линии DBA/2;
- 2) штамм лимфолейкоза мыши P388, резистентный к дактиномицину (P388/ACT-D). Источник культуры клеток — Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (Москва). Клетки хранили в жидком азоте. Штамм поддерживается на мышах линии DBA/2. После разморозки клеток P388 суспензию предварительно перевивали внутрибрюшинно 2–3 мышам линии DBA/2.

Для проведения экспериментов опухолевый материал в виде суспензии опухолевых клеток брали из асцитной жидкости. Подсчет жизнеспособных опухолевых клеток проводили в камере Горяева. Асцитную жидкость разводили в стерильном физиологическом растворе до концентрации 1×10^7 клеток/мл и перевивали мышам линии DBA/2 внутрибрюшинно или подкожно. Внутривенное введение проводили путем инъецирования препарата одноразовым шприцем объемом 1 мл фиксированной мыши в латеральную хвостовую вену. Вводимый объем — 0,2 мл. Количественные критерии оценки ингибирующего эффекта на опухолях животных, удлинения продолжительности жизни определяли в соответствии с методическими рекомендациями для доклинических исследований [34–36]. Схемы экспериментов приведены в табл. 2, 3.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования выполнены графически.

Выживаемость белых беспородных мышей с ААЭ после внутривенного введения препарата белково-векторной доставки дактиномицина и препарата сравнения представлена на рис. 2. Исследование накопления опухолевыми клетками субстанции 7-АД, нано-7-АД и конъюгата АФП с наночастицами, содержащими 7-АД, на модели ААЭ, привитой беспородным мышам при внутрибрюшинном введении, отражено в рис. 3.

Как показано на рис. 3, отмечается достоверно более высокий уровень (в 4,6 раз, $p < 0,0001$) накопления 7-АД в опухолевых клетках при использовании препарата белково-векторной доставки с АФП. Это согласуется с литературными данными, описывающими эксперименты *in vitro* [2, 14].

Таблица 2. Сравнение противоопухолевой активности препарата выбора и прототипа на солидной модели лимфолейкоза Р388 у мышей-самок линии DBA/2 в зависимости от продолжительности курса лечения

Группа	Препарат / введение	Объем опухоли, ($X \pm m$) см ³	Торможение роста опухоли, %	СПЖ, дни	УПЖ, %
15 животных					
I контроль	Через 24 ч после перевивки опухоли 0,2 мл 10% р-ра реополиглукина (в хвостовую вену) 1 раз в день, каждые 48 ч, 7 введений	12,6±3,2	–	14,9	–
II контроль	Через 24 ч после перевивки опухоли 0,2 мл физ. р-ра (в хвостовую вену) 1 раз в день, каждые 48 ч, 7 введений	13,7±4,8	–	14,9	–
10 животных					
III опытная	Через 24 ч после перевивки опухоли препаратом сравнения, внутривенное введение в дозе 85,0 мкг/кг в 0,2 мл р-ра 10% реополиглукина, 1 раз в день, каждые 48 ч, 3 введения	7,8±3,8	40,6	19,8	32,9
IV опытная	Через 24 ч после перевивки опухоли препаратом сравнения, внутривенное введение в дозе 85,0 мкг/кг в 0,2 мл р-ра 10% реополиглукина, 1 раз в день, каждые 48 ч, 5 введений	5,7±3,8	56,6	23,8	60
V опытная	Через 24 ч после перевивки опухоли препаратом сравнения, внутривенное введение в дозе 85,0 мкг/кг в 0,2 мл р-ра 10% реополиглукина, 1 раз в день, каждые 48 ч, 7 введений	4,9±3,8	62,7	26,4	77,1
VI опытная	Через 24 ч после перевивки опухоли препаратом выбора, внутривенное введение в дозе 85,0 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра, 1 раз/сут, каждые 48 ч, 3 введения	5,6±1,9	60,0	32,2	116,1
VII опытная	Через 24 ч после перевивки опухоли препаратом выбора, внутривенное введение в дозе 85,0 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра, 1 раз/сут, каждые 48 ч, 5 введений	2,41±1,1**	81,6	35,1	135,5
VIII опытная	Через 24 ч после перевивки опухоли препаратом выбора, внутривенное введение в дозе 85,0 мкг/кг в 0,2 мл физ. р-ра, 1 раз/сут, каждые 48 ч, 7 введений	1,9±0,9**	83,2	37,8	153,7

Примечание. ** — $p < 0,01$.

Таблица 3. Сравнение противоопухолевой активности препарата белково-векторной доставки и прототипа на асцитной модели лимфолейкоза P388, резистентной к дактиномицину (P388/ACT-D), у мышей-самок линии DBA/2

Группа животных	Доза и режим введения препарата	Объем асцитной жидкости ($X \pm m$), мл	ТРО, %	Продолжительность жизни, дни	УПЖ, %
15 животных					
I контроль	0,2 мл 10% р-ра реополиглобулина в хвостовую вену и внутрибрюшинно 1 раз в день, каждые 48 ч, 7 введений	4,21±0,31	-	11,8±1,6	-
II контроль	0,2 мл 0,9% физ. р-ра в хвостовую вену и внутрибрюшинно 1 раз в день, каждые 48 ч, 7 введений	4,43±0,21	-	12,1±1,24	-
10 животных					
III опытная	Через 24 ч после перевивки опухоли препаратом сравнения в дозе 85 мкг/кг, внутрибрюшинно в 0,2 мл 10% р-ра реополиглобулина, 1 раз в день, каждые 48 ч, 5 введений	3,57±0,19*	21,9*	14,3±1,20*	20
IV опытная	Через 24 ч после перевивки опухоли препаратом выбора в дозе 85,0 мкг/кг, внутрибрюшинно в 0,2 мл физ. р-ра, 1 раз/сут, каждые 48 ч, 5 введений	2,12±0,19**	50,9	20,3 ± 1,31**	70,5

Примечание. * $p < 0,1$; ** — $p < 0,01$.

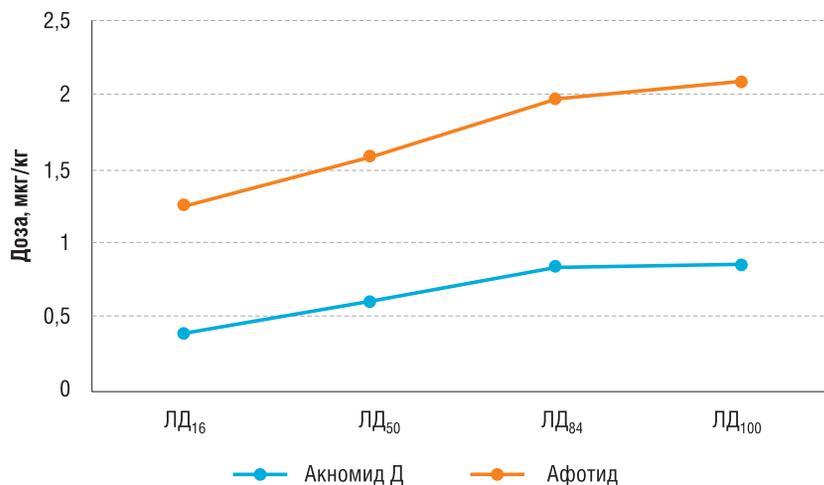


Рис. 2. Сравнение профилей токсичности препарата белково-векторной доставки и прототипа у беспородных мышей с асцитной карциномой Эрлиха

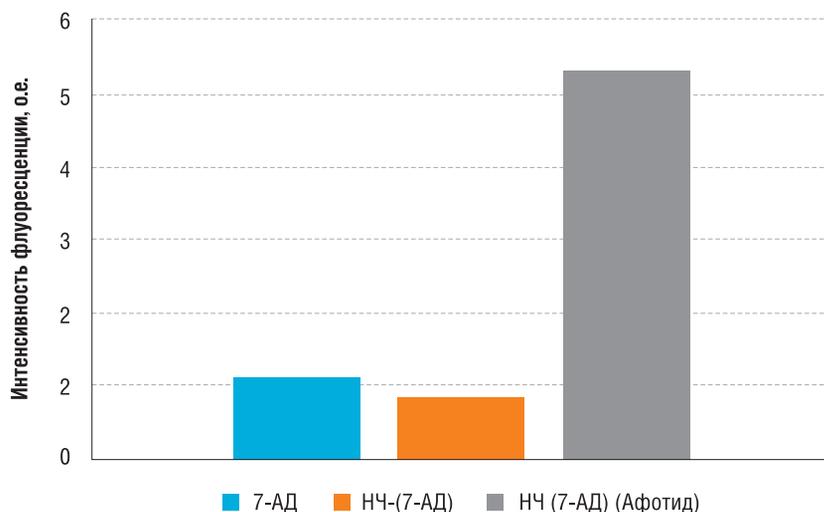


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции (в оптических единицах) опухолевых клеток после интернализации в них субстанции 7-АД (синий цвет), нано-7-АД (оранжевый) и конъюгата альфа-фетопротеина с наночастицами, содержащими 7-АД (серый), на модели ААЗ, привитой беспородным мышам при внутрибрюшинном введении

Изучение противоопухолевой активности препаратов сравнения на солидной модели лимфолейкоза Р388 у мышей-самок DBA/2 представлено на рис. 4.

На рис. 5 дана сравнительная характеристика противоопухолевого действия препарата белково-векторной доставки дактиномицина (VIII опытная группа) и препарата сравнения (V опытная группа) по критериям торможение роста опухоли (ТРО) и удлинения продолжительности жизни (УПЖ).

Изучение сравнительной противоопухолевой активности препаратов сравнения на асцитной модели лимфолейкоза Р388, резистентной к дактиномицину (Р388/АСТ-D), у мышей самок линии DBA/2 представлено на рис. 6.

УПЖ при внутривенном введении препарата белково-векторной доставки дактиномицина и препарата сравнения на асцитной модели лимфолейкоза Р388, резистентной к дактиномицину (Р388/АСТ-D), у мышей-самок линии DBA/2 представлено на рис. 7.

ВЫВОДЫ

1. Исследуемый препарат белково-векторной доставки селективно накапливается в опухолевых клетках и тканях за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза. Этот эффект достигается наличием белково-векторной части (АФП) в конъюгате и наиболее ярко продемонстрирован более высоким уровнем (в 4,6 раз;

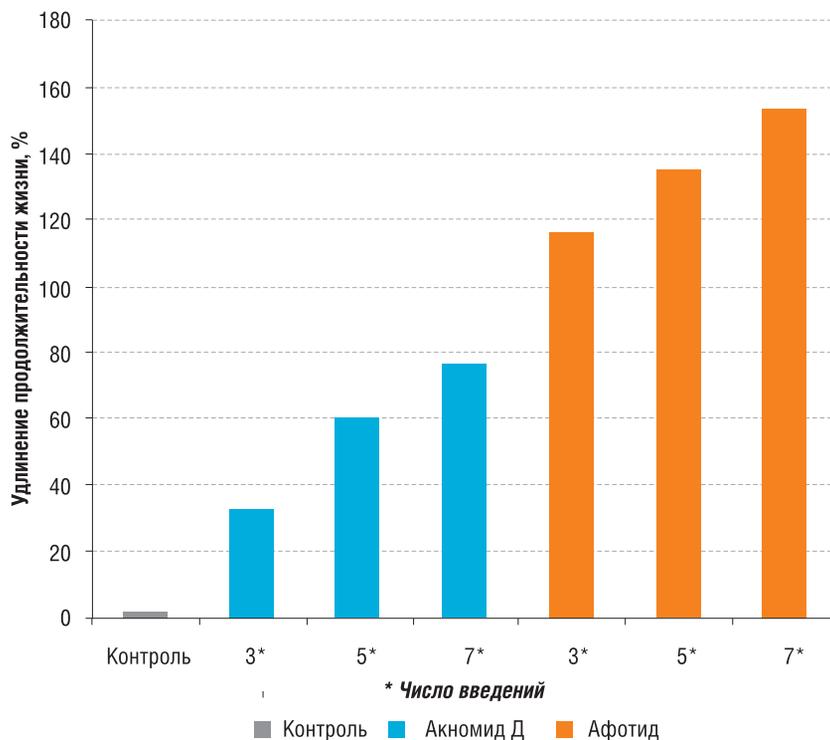


Рис. 4. Удлинение средней продолжительности жизни в зависимости от длительности лечения у мышей с солидной моделью лимфолейкоза Р388 после введения препаратов сравнения

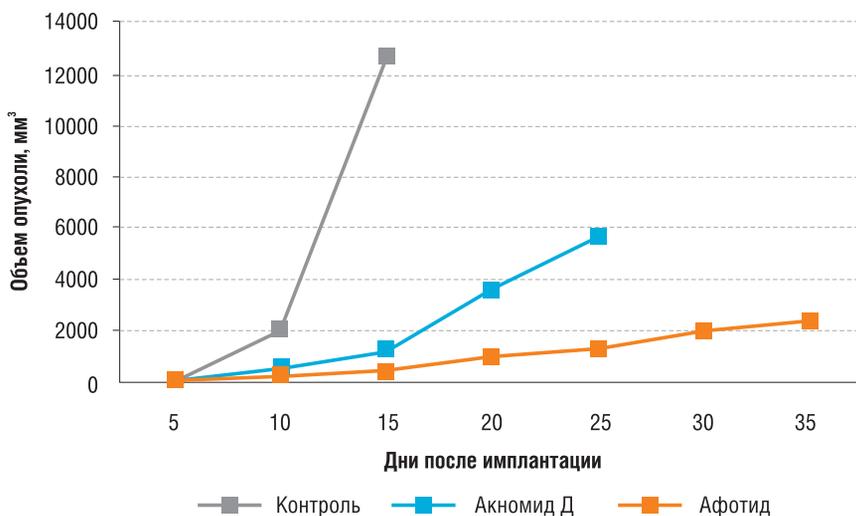


Рис. 5. Сравнительная характеристика противоопухолевого действия препарата белково-векторной доставки актиномицина (VIII опытная гр.) и препарата сравнения (V опытная гр.) по критериям торможения роста опухоли и удлинения продолжительности жизни

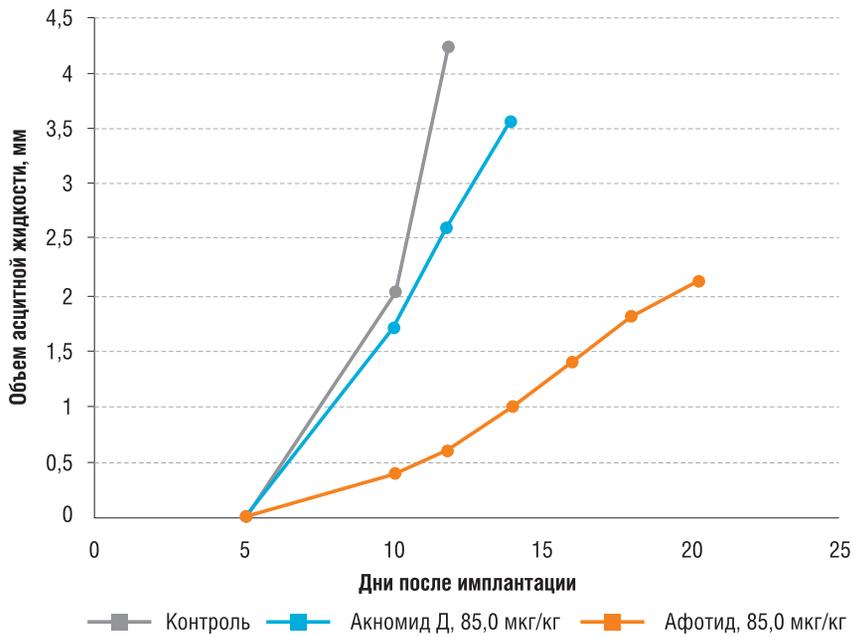


Рис. 6. Противоопухолевая активность препарата белково-векторной доставки дактиномицина и препарата сравнения на асцитной модели лимфолейкоза P388, резистентной к дактиномицину (P388/ACT-D), у мышей самок линии DBA/2
 Примечание. Критерии торможения роста опухоли и удлинения продолжительности жизни при использовании препарата сравнения статистически незначимо отклоняются от контроля — $p < 0,1$.

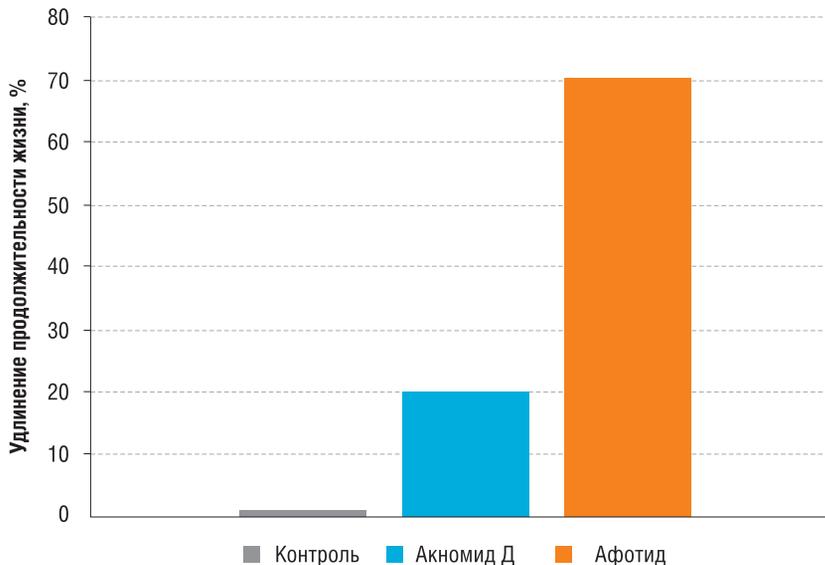


Рис. 7. Удлинение продолжительности жизни при внутривенном введении препаратов сравнения на асцитной модели лимфолейкоза P388, резистентной к дактиномицину (P388/ACT-D), у мышей-самок DBA/2

$p < 0,0001$) накопления 7-АД в опухолевых клетках при включении его в наночастицы, конъюгированные с АФП, при внутрибрюшинном введении мышам с асцитной карциномой Эрлиха.

2. Препарат обладает отчетливо меньшей острой токсичностью, при этом выявлен феномен значительного снижения ее у мышей с моделированной опухолью по сравнению со здоровыми животными. Это, очевидно, связано с использованием полимерных наночастиц, с их медленной деградацией, а также с быстрым выведением препарата из кровотока и накоплением его в опухолевой ткани в связи с высокой аффинностью рецепторов АФП на поверхности опухолевых клеток. Такой механизм приводит к расширению диапазона тера-

певтического окна в 6,55 раз для препарата белково-векторной доставки (119,2 против 60,6 у здоровых животных и 18,2 — у препарата сравнения). При проведении исследования острой токсичности было выявлено значительное увеличение показателя ЛД₅₀ до 1,580 мг/кг против 0,601 мг/кг у препарата сравнения. Такой феномен кардинально расширяет возможности для проведения длительных курсов лекарственной терапии апробируемым препаратом с относительно более высокими разовыми и курсовыми дозами, что, предположительно, должно привести к значительному повышению его клинической эффективности при существенном снижении частоты и выраженности побочных действий.

3. Механизм белково-векторной доставки определяет и существенное повышение противоопухолевого эффекта по критерию ТРО: у чувствительной к дактиномицину опухолевой модели — в 1,48 раза, у резистентной модели — в 2,32 раза. По критерию удлинения продолжительности жизни — в 2,71 и 3,525 соответственно при сравнении со значениями препарата-прототипа.
4. Препарат обладает существенными отличиями от прототипа в плане расширения спектра противоопухолевой активности, в том числе в отношении опухолей, резистентных к препарату сравнения (асцитной модели лимфолейкоза P388, резистентного к дактиномицину, P388/ACT-D).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, использование препарата белково-векторной доставки дактиномицина у мышей с моделированными опухолями приводит к значи-

тельному повышению противоопухолевой эффективности и безопасности по сравнению с прототипом, что согласуется с проведенными ранее экспериментальными исследованиями [1, 2, 15, 18, 20]. Эти результаты представляют серьезное основание для клинического изучения препарата в онкопедиатрии.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Исследование выполнено в рамках Государственного Контракта №14411.2049999.19.110 от 10.12.2014 г. «Трансфер зарубежных разработок инновационного лекарственного средства белково-векторной доставки актиномицинового ряда для лечения онкологических заболеваний, и проведение его доклинических и клинических исследований» (Министерство промышленности и торговли РФ, федеральная целевая программа «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Катлинский А.В., Москалева Е.Ю., Северин Е.С., Сотниченко А.И., Северин С.Е. Направленный транспорт противоопухолевых и антибактериальных препаратов. *Аллергология и иммунология*. 2003;4(3):91–96.
2. Северин Е.С., Круглый Б.И., Северин С.Е. Разработка новых технологий создания лекарственных препаратов избирательного действия. *Аллергология и иммунология*. 2015;16(4):347–350.
3. Северин Е.С., Гнучев Н.В., Воронцов Е.А., Позднякова Н.В., Гукасова Н.В., Северин С.Е., Годованный А.В. Противоопухолевый препарат. Патент RU 2451509 С1.
4. Валиев Т.Т., Левашов А.С., Сенжапова Э.Р. Таргетные препараты в детской онкологии. *Онкопедиатрия*. 2016;3(1):8–15. Doi: 10.15690/onco.v3i1.1524.
5. Абелев Г.И. Что такое опухоль? *Соросовский образовательный журнал*. 1997;10:85–90.
6. Горбунова Т.В., Березовская И.В., Поляков В.Г. Применение дактиномицина при солидных опухолях у детей. *Онкопедиатрия*. 2014;4:34–39.
7. Горбунова Т.В., Березовская И.В., Постникова Т.В. Сравнительная характеристика токсичности противоопухолевых антибиотиков группы актиномицинов при лечении солидных опухолей у детей. *Онкопедиатрия*. 2014;1:20–24.
8. Philips FS, et al. The toxicity of Actinomycin D. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1960;89(2):348–360.
9. Векшин Н.Л. Биофизика ДНК-актиномициновых нанокмлексов. *Пуццино: Фотон-век*. 2009. 192 с.
10. Waksman SA. Associative and antagonistic effects of microorganisms II. Antagonistic effects of microorganisms grown on artificial substrates. SA Waksman, JW Foster. *Soil Sci*. 1937;43(1):69–76.
11. Зенин В.А., Круглый Б.И., Никольская Е.Д., Белов А.В., Яббаров Н.Г., Сиротюк Д.О., Тюляев А.И. Изучение физико-химических и биологических свойств фармацевтической субстанции дактиномицина. *Биотехнология*. 2016 (в печати).
12. Ницветов М.Б., Караулов А.В., Москалева Е.Ю., Родина А.В., Посыпанова Г.А., Сологуб В.К., Попова О.Н., Шмырев И.И., Северин С.Е., Северин Е.С. Моноклональные антитела к рецептору альфа-фетопротеина. Возможность иммунодиагностики, иммунопрофилактики и иммунотерапии онкологических заболеваний. Материалы II Российской конференции молодых ученых с международным участием 24–27 апреля 2001. М., 2001;1:185.
13. Ницветов М.Б., Москалева Е.Ю., Сладкова Л.В., Родина А.В., Посыпанова Г.А., Лопова О.Н., Сологуб В.К., Караулов А.В., Северин С.Е., Северин Е.С. Анализ количества и активности рецепторов АФП на чувствительных и резистентных опухолевых клетках и преодоление множественной лекарственной устойчивости с помощью направленного транспорта доксорубина через рецептор АФП. I Всероссийская научно-практическая конференция «Биотерапия рака». М., 2002. С. 73.
14. Северин Е.С., Посыпанова Г.А. Молекулярная физиология рецептор-опосредованного эндоцитоза и его роль в преодолении множественной лекарственной устойчивости. *Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова*. 2011;6:553–565.
15. Москалева Е.Ю., Шмырев И.И., Кривонос А.В., Северин Е.С. Противоопухолевая активность конъюгатов цитотоксических препаратов с альфа-фетопротеином. *Рос. онкологический журнал*. 1997;4:29–32.
16. Ницветов М.Б., Родина А.В., Москалева Е.Ю. и др. Характеристика моноклональных антител к рецептору АФП в сравнении с АФП по их взаимодействию с опухолевыми клетками человека. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2001;3:19–25.
17. Ницветов М.Б., Москалева Е.Ю., Макарова О.В., Сладкова Л.В., Родина А.В., Посыпанова Г.А., Попова О.Н., Сологуб В.К., Коромылова И.А., Караулов А.В., Северин С.Е., Северин Е.С. Выявление рецептора АФП с помощью иммуногистохимического окрашивания моноклональными антителами. 5-й Конгресс «Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии». М., 2002. С. 106.
18. Ницветов М.Б., Москалева Е.Ю., Сладкова Л.В., Родина А.В., Посыпанова Г.А., Попова О.Н., Коромылова И.А., Караулов А.В., Северин С.Е.,

- Северин Е.С. Характеристика чувствительных и резистентных к доксорубину опухолевых клеточных линий по уровню экспрессии рецептора альфа-фетопротеина и способности к рецептор-опосредованному эндоцитозу. *Молекулярная медицина*. 2003;2:57–60.
19. Ницветов М.Б., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А., Макарова О.В., Степанов В.А., Рогов К.А., Попова О.Н., Сологуб В.К., Коромылова И.А., Караулов А.В., Северин С.Е., Северин Е.С. Экспрессия РеАФП в опухолевых и нормальных тканях человека. Материалы 3-й Научной конференции и школы-семинара для молодых ученых «Белки-маркеры патологических состояний». Астрахань-Москва. 2003. С. 14–19.
 20. Северин Е.С., Константинова С.В., Северин С.Е. проблемы преодоления множественной лекарственной устойчивости. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2009;2:3–13.
 21. Северин Е.С., Москалева Е.Ю., Родина А.В., Клименко П.А. Противоопухолевая активность конъюгата антибиотика эсперамицина А1 с альфа-фетопротеином человека. М.: Доклады АН. 1999;366(4):561–564.
 22. Северин Е.С., Ницветов М.Б., Москалева Е.Ю., Сологуб В.К., Белоусова Ю.В., Коромылова И.А., Родина А.В., Караулов А.В. Изучение возможности использования моноклональных антител к рецептору альфа-фетопротеина для регуляции противоопухолевого иммунитета. Вторая международная ассамблея «Новые медицинские технологии». Аптека-2000. М., 2000. С. 68–69.
 23. Uriel J, Villacampa MJ, Moro R, Naval J, Faily-Crépin C. Uptake of radiolabeled alpha-fetoprotein by mouse mammary carcinomas and its usefulness in tumor scintigraphy. *Cancer Res*. 1984 Nov;44(11):5314–9.
 24. Hajeri-Grmond M, et al. The uptake of alpha-foetoprotein by C-1300 mouse neuroblastoma cells. *Br J Cancer*. 1985;51:791–797.
 25. Villacampa MJ, et al. α -Fetoprotein receptors in a human breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;122:1322–7.
 26. Naval J, et al. Cell type-specific receptors for AFP in a mouse T-lymphoma cell line. *Proc Natl AcadSci USA*. 1985; 82:3301–3304.
 27. Suzuki Y, et al. Isolation and characterization of a specific alpha-fetoprotein receptor on human monocytes. *J Clin Invest*. 1992;90:1530–1536.
 28. Балабаньян В.Ю. Фармакологические и фармацевтические аспекты создания наноразмерных форм факторов роста нервной ткани, феназепам и паклитаксела. Автореф. дисс. ...канд. фармац. наук. М., 2015.
 29. Дурнев А.Д. Токсикология наночастиц. *БЭБМ*. 2008;145(1):78–80.
 30. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. Под ред. проф. В.В. Меньшикова. М.: Медицина. 1987. 368 с.
 31. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. МР 1.2.2522-09. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2009. 35 с.
 32. Куценко С.А. Основы токсикологии. СПб.: Фолиант. 2004. 720 с.
 33. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Part Fibre Toxicol*. 2006;3:11.
 34. Глазкова Т.Г., Софьина З.П., Горбунова В.А., Смирнова З.С., Герасимова Г.К. Оценка информативности экспериментальных тестов, используемых для прогноза клинической активности противоопухолевых препаратов. Информативность различных экспериментальных опухолей мышей.
 35. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
 36. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005. С. 59–65.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Круглый Борис Игоревич, кандидат медицинских наук, главный научный сотрудник ООО «Лаборатория инновационных научных исследований в медицине»

Адрес: 115093, Москва, ул. Дубининская, д. 90, **тел.:** +7 (495) 958-16-52, **e-mail:** boris@linam.ru

Никольская Елена Дмитриевна, руководитель научно-производственной лаборатории ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения»

Адрес: 117149, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, **тел.:** +7 (499) 613-23-50, **e-mail:** elenanikolskaja@gmail.com

Северин Евгений Сергеевич, доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения»

Адрес: 117149, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, **тел.:** +7 (499) 613-23-50, **e-mail:** e.severin@mail.ru

Барсегян Геворкбек Гайкович, кандидат биологических наук, заведующий вивариумом ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения»

Адрес: 117149, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, **тел.:** +7 (499) 613-23-50, **e-mail:** morze1@list.ru

Яббаров Никита Григорьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения»

Адрес: 117149, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, **тел.:** +7 (499) 613-23-50, **e-mail:** marvint@inbox.ru

Терещенко Оксана Геннадьевна, старший научный сотрудник ООО «Лаборатория инновационных научных исследований в медицине»

Адрес: 115093, Москва, ул. Дубининская, д. 90, **тел.:** +7 (495) 958-16-52, **e-mail:** oarsenkova@mail.ru

Жунина Ольга Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения»

Адрес: 117149, Москва, Симферопольский бульвар, д. 8, **тел.:** +7 (499) 613-23-50, **e-mail:** olga_yarova@bk.ru

Зенин Владимир Андреевич, старший научный сотрудник ООО «Лаборатория инновационных научных исследований в медицине»

Адрес: 115093, Москва, ул. Дубининская, д. 90, **тел.:** +7 (495) 958-16-52, **e-mail:** zenanmail@icloud.com

Тюляев Александр Иванович, кандидат фармацевтических наук, главный научный сотрудник ООО «АдиКом»

Адрес: 127591, Москва, ул. Дубининская, д. 79Б, **тел.:** +7 (495) 645-80-19, **e-mail:** tyulyaev_a@adikom.msk.ru