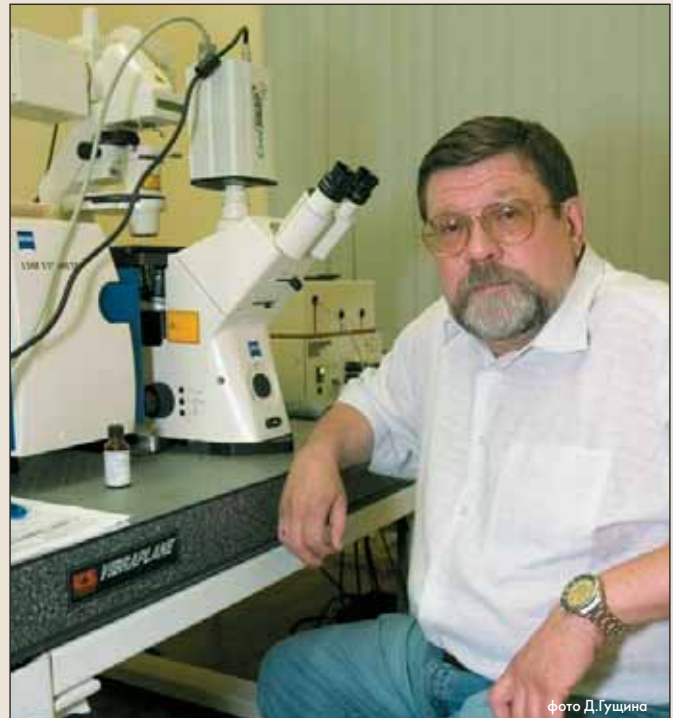


Конструкции, проникающие в клетку

Профессор А.С. Соболев, заведующий лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта, Институт биологии гена РАН; профессор каф. биофизики Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

В 1986 г. американский ученый Эрик Дрекслер написал книгу «Машины созидания: грядущая эра нанотехнологий»¹, в которой он, в частности, рассказал о том, какими должны быть лекарства нового поколения. С его точки зрения, это будут лекарства направленного действия. Однако термин «наномедицина» предложил не Дрекслер, а его соотечественник Роберт Фрайтас. Он подробно изложил, что понимается под этим термином, в своем многотомном труде, который был так и озаглавлен – «Наномедицина»². Основная мысль этой книги в том, что в грядущем столетии принципиальный аспект или интерес сдвинется с медицинской науки на инженерную медицину, наномедицина включит в себя разработку особо эффективных молекулярных конструкций, которые, будучи примененными на практике, позволят улучшить здоровье людей. Представления о наномедицине, сформулированные Фрайтасом, видятся мне наиболее адекватными для понимания сути этой отрасли нанотехнологий.

Если мы перейдем к конструкциям, о которых писал в 1999 г. Фрайтас, то возникает вопрос, как принципиально они должны быть устроены. Эта тема популярна сейчас во всем мире, и мы с коллегами из лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта активно работаем над созданием таких конструкций. Попробуем разобраться, с какими проблемами и препятствиями могут сталкиваться ученые при разработке подобного рода конструкций. Представим себе клетку-мишень и в ней – определенный компартмент (обособленную мембраной область клетки), в который должно попасть лекарственное вещество, доставляемое носителем – специальной наноконструкцией. При этом клетка-мишень окружена обычными клетками, которые мишенями для лекарственного вещества не являются. Первая задача состоит в том, что наноконструкция должна опознать клетку-мишень, выделить ее как-то из окружающих ее не-мишеней. Вторая – узнав эту клетку, такая конструкция должна попасть внутрь нее. Но как это сделать? Обычно разработчики стараются найти на поверхности клетки-мишени такие молекулы, которые наличествуют преимущественно у этой клетки, а в окружающих клетках отсутствуют, и второе крайне важное условие: чтобы эти особенные для данного типа клеток молекулы еще обладали способностью прони-



Профессор А.С. Соболев – один из ведущих специалистов в области адресной доставки лекарств

кать внутрь, путем т.н. рецептор-опосредуемого эндоцитоза. И если такие молекулы найдены – как правило, это рецепторы, – то тогда можно сразу решить обе задачи: опознать тип клеток и пройти внутрь клетки-мишени, потому что такие рецепторы по стандартному внутриклеточному транспортному механизму втягиваются внутрь клетки.

Третья задача – попасть внутрь желаемого компартмента, скажем, в ядро. Чтобы этого достичь, наноконструкция должна иметь «адрес» – некую аминокислотную последовательность, которая будет опознана внутриклеточной машинерией и благодаря этому конструкция будет отправлена куда надо, например, в клеточное ядро. И здесь возникает четвертая задача. Дело в том, что наноконструкция, попав в клетку путем эндоцитоза, оказывается заключенной в мембранный пузырек, который отделяет ее от той внутриклеточной машинерии, которая должна опознать аминокислотную последовательность и направить в нужный компартмент. Поэтому после проникновения наноконструкции в клетку и в пузырек этот пузырек нужно обязательно прорвать. И наконец, последняя задача:

¹ K. Eric Drexler, *Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*, Anchor Books, New York. 1986.

² Robert A. Freitas Jr., *Nanomedicine. V. I: Basic Capabilities*, Landes Bioscience, Georgetown, TX. 1999.

у нашей конструкции должен быть компонент, который бы нес транспортируемое лекарство. Таким образом, мы приходим к выводу, что должны решать одной молекулой как минимум пять задач. Соответственно, у нее должно быть несколько компонентов, чтобы пройти через все перечисленные выше препятствия. Но таких молекул в природе нет, значит, их надо создавать. Причем желательно, чтобы эти молекулы-конструкции были модульными, т.е. предусматривалась возможность быстрой замены компонентов и перестановки их в зависимости от решаемой задачи. Поскольку конструкции представляют собой молекулярные или надмолекулярные образования, то мы автоматически получаем наноразмерные объекты, которые в рамках определений, данных Фрайтасом, будут называться нанотранспортерами. Таким образом, мы подошли к тому, что для достижения задачи доставки лекарственного вещества внутрь определенного компартмента клетки-мишени нам целесообразно создавать модульные нанотранспортеры¹.

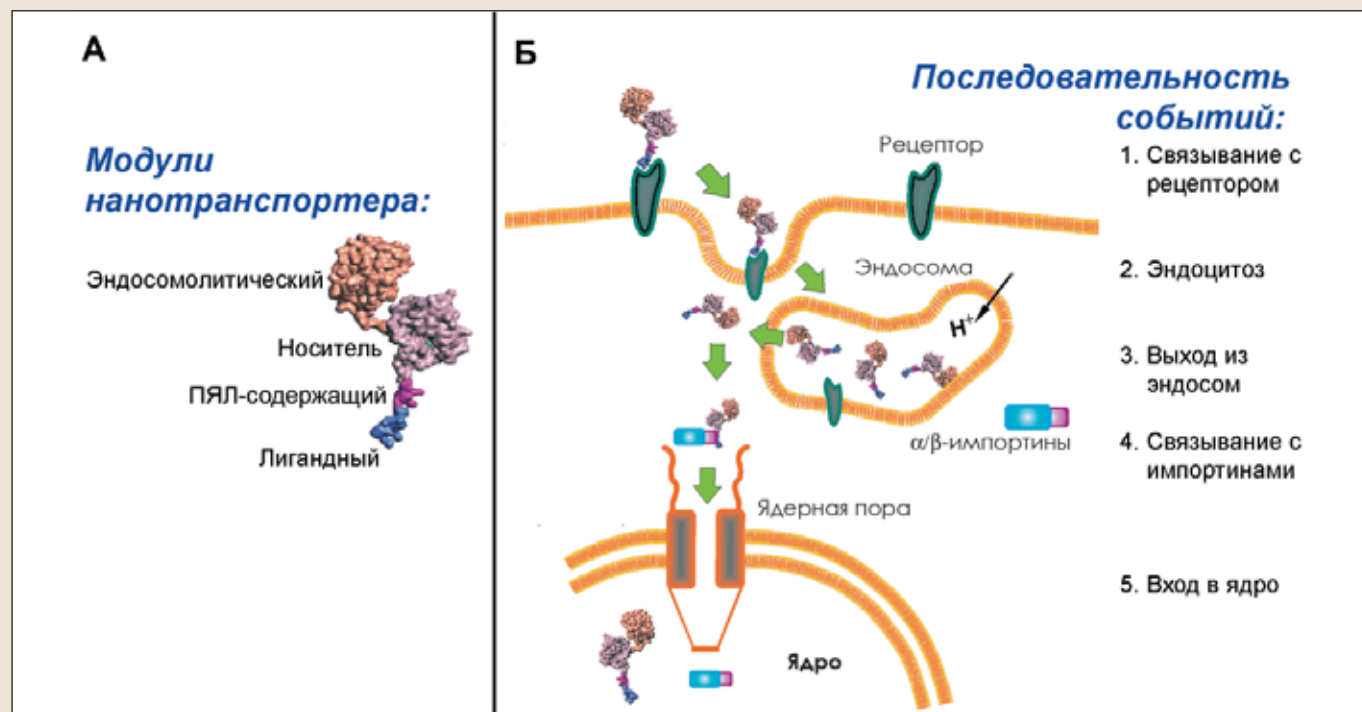
Эту задачу мы начали решать достаточно давно, еще в 1988 г. В последние годы нам удалось продвинуться в этом направлении. Мы сделали целый набор нанотранспортеров, которые состоят из четырех модулей. Первый модуль мы называем лигандным, он узнает клетку-мишень и связывается с рецептором этой клетки, который потом путем рецептор-опосредуемого эндоцитоза втаскивает нанотранспортер внутрь. Второй модуль содержит адрес — последовательность ядерной локализации, ту аминокислотную последова-

тельность, которая направляет в ядро весь нанотранспортер. Третий — модуль-носитель, который сопрягает все воедино, включая лекарство. И четвертый модуль — эндосомолитический, названный так из-за пузырьков-эндосом, в которых оказывается конструкция в результате рецептор-опосредуемого эндоцитоза и которые этот модуль «дырявит». Мы сделали несколько видов конструкций такого состава, для того чтобы сориентировать их на разные типы раковых клеток.

Начали мы с меланомы, потом перешли к другим типам раковых клеток, таким как рак головы и шеи, рак мочевого пузыря, некоторые варианты рака легких, потом сделали нанотранспортеры для доставки лекарства в клетки острого миелоидного лейкоза, и, наконец, транспортеры для доставки в клетки нейробластомы. На следующем этапе наших исследований мы должны были оценить, действительно ли каждый из этих модулей сохраняет те функции, которыми мы хотели наделить весь нанотранспортер. В течение полутора лет мы тщательно тестировали каждый наш транспортер, и только убедившись, что нам действительно удалось сделать такую конструкцию, в которой каждый модуль доступен, функционален, его не экранируют другие модули, мы решили двигаться дальше.

В ходе проверки мы установили, что нанотранспортер попадает в клетки-мишени, не повреждая соседей. Внутри клеток-мишеней срабатывает эндосомолитический модуль, транспортер высвобождается из эндосом и попадает в ядро. И тогда мы решили испытать нашу конструкцию в «боевой» обстановке: для прямых задач доставки лекарственных средств. Какие лекарственные средства желательно доставлять в ядро при помощи подобного транспортера? Те, действие кото-

¹ Sobolev A.S. Modular Transporters. In: Encyclopedia of Cancer. 4 Vols., 2nd Ed. M. Schwab (ed.). Springer Verlag: Berlin-Heidelberg-N.Y.-Tokyo, 2008, 1932-1933.



А. Строение четырехмодульного нанотранспортера. Б. Процесс проникновения нанотранспортера в зараженный компартмент клетки

рых наиболее выражено или может осуществляться только в клеточном ядре. Так, для фотодинамической терапии рака в качестве лекарственных средств используются фотосенсибилизаторы, при радиотерапии рака — радиоизотопы, и были основания считать, что эти лекарственные вещества заработают намного лучше, если их доставить в ядра клеток-мишеней. Когда мы присоединили фотосенсибилизаторы к нанотранспортеру, то оказалось, что их лечебная доза уменьшается в тысячи раз за счет того, что транспортер доставляет фотосенсибилизатор прямо в ядро клетки, а не на ее периферию, при этом фотосенсибилизатор поражает исключительно клетки-мишени, не затрагивая их здоровых соседей¹.

Аналогично мы поступили с транспортерами для доставки радионуклидов, испускающих α -частицы (с ними мы работали вместе с американскими коллегами из Университета Дюка)². Особенность α -частиц состоит в том, что они максимально эффективно убивают клетки, если попадают в их ядра, поэтому, используя транспортер, удалось в десятки раз увеличивать эффективность радионуклидов, в частности At^{211} .

В опытах на животных мы вводим им в кровь нанотранспортеры с лекарствами; двигаясь с кровью, они «находят» опухолевые клетки, проникают в их ядра и эффективно поражают эти клетки. Если говорить о поздних стадиях онкологического заболевания, когда опухоль дала метастазы и не всегда известно, где находятся эти метастазы, то я думаю, что нанотранспортеры будут способны найти возникшие метастазы и их уничтожить. Надеюсь, что соответствующие испытания, в т.ч. числе и клинические, подтвердят мою правоту.

Другое направление нашей работы — доставка нуклеиновых кислот с помощью полимерных конструкций для целей генотерапии. Тогда, в 1988 г., мы думали, что окажемся первопроходцами, но потом обнаружили статью Джорджа Ву из Университета штата Коннектикут, которая вышла раньше нашей.

Мы разработали специальные полимерные конструкции, которые образуют комплекс полимера с ДНК размером 50–60 нм, — «полиплекс». Такой комплекс может попасть в определенные клетки, доставлять в них ДНК и таким образом переносить соответ-

Где проводить доклинические испытания?

Существует ряд организационных проблем, мешающих нам двигаться вперед. К сожалению, в России, за редким исключением, слаба база для доклинических испытаний. Я считаю, что надо создавать учреждения для доклинических испытаний, причем их должно быть несколько, чтобы не поощрять монополистов. Эти учреждения должны быть приспособлены под нужды разработчиков. Мы еще мало знаем о фармакокинетике и фармакодинамике наномедицинских препаратов, поэтому стандартные подходы и протоколы для них не всегда годятся, а это значит, что разрабатывать методические рекомендации нужно совместно с тестирующими. Не все учреждения для доклинических испытаний должны обладать полным спектром методов исследования, но им следует иметь сертификат для производства минимума тестов, используя которые, можно оценить, стоит ли продвигать этот препарат дальше к крупным центрам со всем спектром возможностей тестирования или его нужно дорабатывать. Мы проводим ряд важных опытов на животных у наших зарубежных партнеров — в Голландии и США, где есть возможность экспериментировать на бестимусных животных, что крайне необходимо для тестирования препарата на животной модели опухолей человека (а опухоли из раковых клеток человека можно создать лишь на иммунодефицитных, бестимусных животных). В России таких лабораторных животных практически нет, а также нет других необходимых нам животных моделей.

ствующий генетический материал³. Нам удалось так трансфицировать молочные железы овец, чтобы они с молоком вырабатывали репортерный белок, который естественным образом не образуется. Мы сделали такую химеру специально, чтобы убедиться в работоспособности метода. Сейчас наш коллектив работает в программе по генотерапии рака, которой руководит академик Евгений Давидович Свердлов⁴. По предварительным данным, полученным на клеточных культурах, полиплексы способны доставлять терапевтические гены, убивающие раковые клетки. Сейчас мы делаем эксперименты на мышах и надеемся, что метод покажет себя как эффективный и безопасный (первые результаты свидетельствуют в пользу этого).

¹ Sobolev A.S. Modular transporters for subcellular cell-specific targeting of anti-tumor drugs. *BioEssays*, 2008. 30: 278-287.

² Rosenkranz A.A., Vaidyanathan G., Pozzi O.R., Lunin V.G., Zalutsky M.R., Sobolev A.S. Engineered modular recombinant transporters: application of new platform for targeted radiotherapeutic agents to alpha-particle emitting ^{211}At . *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2008. 72:193-200.

³ Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditskiy B.S., Shilov I.N., Shatski I.N., Ernst L.K. Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo. *J. Biol. Chem.* 1998. 273:7928-7933.

⁴ Гены-убийцы атакуют рак, strf.ru