

УДК 615.355:577.52.429.07

Кардиологические биофармацевтики в концепции направленного транспорта лекарств: практические результаты и исследовательские перспективы

А. В. Максименко

Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздравсоцразвития Российской Федерации, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

E-mail: alexmak@cardio.ru

Поступила в редакцию 30.11.2011 г.

РЕФЕРАТ Рассмотрены результаты клинического применения тромболитических и антитромботических препаратов, разработанных на основе белковых конъюгатов в рамках концепции направленного транспорта лекарств. Отмечено сокращение научно-медицинских разработок таких производных из-за значительного истощения финансово-организационных ресурсов, появления новых препаратов и средств интервенционного вмешательства. Выявлены факторы, способствующие заметному повышению эффективности действия биоконъюгатов, в том числе биомедицинское тестирование белковых доменов и их сочетаний, оптимизация размеров биоконъюгатов, плотность локализации мишеней, использование в качестве мишеней молекул клеточной адгезии, а также применение сопряженных друг с другом ферментов. Заметный интерес вызывают антиоксидантные биокатализаторы, а также возможность дальнейшего совершенствования направленного транспорта лекарств посредством пре- и посткондиционирования миокарда и выявления и формирования мишеней для эффективного лекарственного воздействия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА направленный транспорт лекарств, белковые конъюгаты, тромболитики, антитромботические средства, плотность молекулярных мишеней, ферментативно сопряженные антиоксиданты, молекулы клеточной адгезии, пре- и посткондиционирование миокарда.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СОД – супероксиддисмутаза; ВК-СОД – внеклеточная СОД; КАТ – каталаза; СМП – скорая медицинская помощь; ХС – хондроитинсульфат; СОД-ХС-КАТ – ковалентный биферментный конъюгат супероксиддисмутаза-хондроитинсульфат-каталаза; ЭКГ – электрокардиограмма.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее считалось, что лекарственные средства в очаг патологического поражения можно доставить при помощи «магических пуль» Пауля Эрлиха [1]. Это представление легло в основу концепции направленного транспорта лекарств в организме [2], один из объектов которой – белковые конъюгаты, полученные методами химического и биологического синтеза [3, 4]. Значимой областью направленного внеклеточного применения таких конъюгатов стал тромболитический [5]. Прошедшие с той поры десятилетия позволили оценить результаты использования таких агентов (биофармацевтиков) в тромболитической и сопутствующей ей (смежной) терапии, а также выявить направления дальнейших биофармакологических разработок. Этому посвящен настоящий аналитический обзор, составленный с использованием баз данных PubMed, SCOPUS, Index Medicus/MEDLINE

и других, а также научно-медицинского библиотечного фонда Кардиологического научного центра (Москва).

НОВЫЕ ПРЕПАРАТЫ ТРОМБОЛИТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Высокая распространенность сердечно-сосудистых заболеваний хорошо известна. В России показатель смертности от этих заболеваний превышает половину от общего показателя [6]. Тяжелые и массовые проявления сердечно-сосудистых нарушений могут развиваться как постепенно, так и довольно внезапно. Появление загрудинных болей (ишемический дискомфорт) позволяет подозревать прогрессирование острого коронарного синдрома (рис. 1) [7]. Регистрация электрокардиограммы (ЭКГ) способствует выявлению пристеночного или окклюзирующего (полностью перекрывающего люминальный просвет сосуда) тромба по уровню ST-сегмента на ЭКГ. Определение

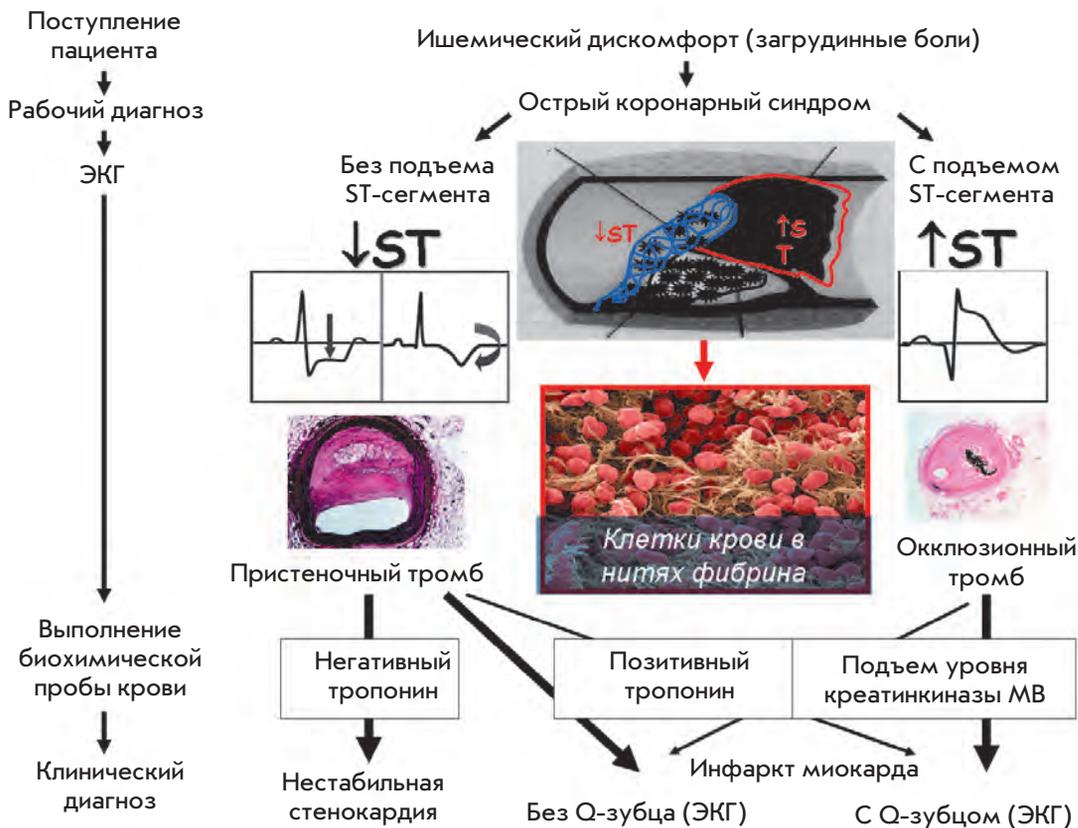


Рис. 1. Последовательность (алгоритм) постановки клинического диагноза пациенту с острым сердечно-сосудистым поражением.

содержания в крови креатинкиназы (изоформы МВ) и/или тропонина (Т или I) уточняет постановку клинического диагноза (рис. 1) [7, 8]. Лечение больных острым инфарктом миокарда требует скорейшего проведения тромболитической терапии.

В качестве тромболитических агентов в России используются стрептокиназа (1,5 млн МЕ для внутривенной инфузии в течение 30–60 мин), альтеплаза (рекомбинантный тканевый активатор плазминогена, 15 мг препарата вводят внутривенным болюсом (инъекцией) с последующей инфузией в дозе 0,75 мг/кг в течение 30 мин и еще одной инфузией 0,5 мг/кг в течение 60 мин, суммарно менее 100 мг препарата), тенектеплаза (мутантная форма (мутеин) тканевого активатора плазминогена; 30–50 мг препарата вводят внутривенно в зависимости от массы пациента – 60 и более 90 кг), пулолаза (проурокиназа, 2 млн МЕ препарата вводят внутривенно с последующей инфузией 4 млн МЕ в течение 30–60 мин). В России стандарт медицинской помощи предписывает применять при остром инфаркте миокарда (приказ Министерства здравоохранения и социального развития от 2 августа 2006 г. № 582) альтеплазу (коммерческое название актилизе), стрептокиназу и проурокиназу (пулолазу), т.е. тромболитики с болюс-инфузионной

схемой введения. Использование таких болюсных агентов, как продвигающаяся на российский лекарственный рынок тенектеплаза (коммерческое название метализе), носит пока эпизодический характер.

Следует заметить, что если стрептокиназа (SK), белковый продукт β-гемолитических стрептококков, относится к первому поколению активаторов плазминогена (как и урокиназа, UK), то тканевый активатор плазминогена (t-PA) и проурокиназа (u-PA, pro-UK) принадлежат ко второму поколению [9]. Производство активаторов плазминогена в виде негликозилированных производных (актилизе, пулолаза) стало возможным благодаря использованию методов генной инженерии (рис. 2). Из активаторов плазминогена третьего поколения пока клинически используются лишь тенектеплаза (TNK-tPA, метализе) и ретеплаза (r-PA, ретаваза). Их продвижение к терапевтическому применению подчеркивает особенности современной биофармакологии и биотехнологии – значительную продолжительность разработки и высокую стоимость выпускаемого продукта (цена эффективной дозы препарата составляет 2000–3000 долларов США). Некоторые новые формы активаторов плазминогена (анизотирированный плазминоген-стрептокиназный активаторный комплекс – APSAC,



Рис. 2. Хронология появления в клинической практике агентов (активаторы плазминогена разных поколений) и ангиопластических средств (баллонный катетер, стенты) реперфузионной терапии.

ланотеплаза – n-PA (мутантный t-PA, мутеин t-PA)) не получили по ряду терапевтических показателей дальнейшего распространения, использование других (r-PA, TNK-tPA, пулолаза) постепенно увеличивается.

Ретаваза (r-PA), рекомендуемая для последовательного двойного болюсного введения при остром инфаркте миокарда, представляет собой негликозилированный t-PA, из молекулы которого удалены несколько доменов – пальцеобразный, гомологичный эпидермальному фактору роста, а также крингл-домен 1 [10]. Благодаря такой модификации r-PA действует быстро, долго пребывает в кровотоке, вызывает меньшее истощение уровня гемостатических белков крови (системное действие), чем родительская форма t-PA. Сходными преимуществами обладает и тенектеплаза (она слабее подавляет активность ингибитора активатора плазминогена первого типа и отличается сниженным участием в фибринолизе). Комбинация мутаций в молекуле t-PA (замены T103N, N117Q, KHRR(296–299)AAAA) обусловила появление перечисленных свойств и позволила получить препарат, эффективный после однократного болюсного внутривенного введения при остром инфаркте миокарда [11, 12]. Нацеливание производных r-PA и TNK-tPA на тромб (реализация концепции направленного транспорта лекарств) удалось осуществить не в результате использования внешнего вектора (например, моноклональных антител/их фрагментов к фибрину), а благодаря отбору мутантных форм t-PA и выделению его доменов. Нормальная молекула t-PA состоит из нескольких структурных доменов [9]: фибронектинового пальцеобразного, отвечающего за высокоаффинное связывание с фибрином; гомологичного эпидермальному фактору роста, обеспечивающему рецепторное связывание

с клетками печени и ускоренный клиренс; а также двух крингл-доменов – существенного для связывания с рецепторами эндотелиальных клеток домена 1 и ответственного за низкоаффинное связывание с фибрином домена 2. В состав t-PA входит также протеиназный домен, обладающий протеиназной активностью, специфичной к плазминогену. Протеиназный домен содержит участок связывания ингибитора активатора плазминогена первого типа. Молекулярная масса такого одноцепочечного гликопротеина составляет ~ 64 кДа. Полученные на его основе генно-инженерными методами тенектеплаза (метализе) и ретаваза (ретаваза) способствуют дальнейшему развитию тромболитической терапии (рис. 2). Так, по усовершенствованной двухэтапной схеме (с использованием кардиотелеметрии ЭКГ) общепрофильными бригадами скорой медицинской помощи (СМП), укомплектованными врачебными или фельдшерскими кадрами, проведен догоспитальный болюсный тромболитический тенектеплазой [13]. Эффективность тромболитической терапии в существенной мере определялась временным интервалом «симптом–игла», средняя величина которого составляла 1 ч 58 мин, а время «дверь–игла» (от появления СМП до начала инъекции) – 16 мин. Такое заметное сокращение времени до начала терапии способствовало эффективному лечению 51.5% пациентов (один из критериев – снижение ST-сегмента на ЭКГ более чем на 50% в отведении, где его подъем был максимальным). У 18.2% больных наблюдался «прерванный инфаркт миокарда» (когда снижение ST-сегмента достигало изолинии ЭКГ). В присутствии бригады СМП летальность составила 1.5%, в течение суток – 3.0%, в течение 30 дней – 1.5%. Таким образом, при проведении тромболитической терапии общепрофильными бригадами СМП показатели летальности не только не увеличивались, но и обеспечивали значительное сокращение времени до начала лечения, что может существенно улучшать прогноз при остром инфаркте миокарда с подъемом ST-сегмента на ЭКГ [13]. Учитывая необходимость урегулирования вопроса стоимости препарата тенектеплазы, приборного оснащения бригад СМП, организации базовых центров кардиотелеметрии и подготовки и обучения медперсонала, такой подход к обеспечению максимально раннего тромболитического лечения может оказаться весьма действенным для достоверного улучшения борьбы с острыми сердечно-сосудистыми поражениями.

ФОРМИРОВАНИЕ И РАЗВИТИЕ РЕПЕРFUЗИОННОЙ ТЕРАПИИ

Появление тромболитической терапии революционизировало лечение острого инфаркта миокарда. Если госпитальная летальность от инфаркта миокарда



Рис. 3. Зависимость показателя летальности (в течение 30–35-дневного интервала) от времени начала реперфузионной терапии тромболитическими и интервенционными методами. Очерчена область преимущественного применения тромболитической терапии.

еще в середине прошлого века составляла 30–40%, то с введением в клинический обиход палат интенсивного наблюдения (терапии) она снизилась вдвое (14–17%) [14]. Развитие тромболитической терапии позволило существенно снизить показатель смертности, выведя его на уровень 6–8%. Необходимость дальнейшего снижения летальности от инфаркта миокарда обусловила формирование и совершенствование реперфузионной терапии, опирающейся на тромболитические препараты, методы и средства транслюминальной (баллонной) ангиопластики и стентирования (рис. 2). Эффективность интервенционных методов восстановления кровотока механическим воздействием оказалась весьма высокой, но имела и свои ограничения (рис. 3). Согласно Рекомендациям Европейского общества кардиологов при острых сердечно-сосудистых поражениях следует добиваться оказания скорейшей медицинской помощи. Это подразумевает быстрое прохождение «пяти дверей»: дома (1), консультации/осмотра врача общей практики (2), диспетчера скорой помощи (3), оказания первой помощи и транспортировки службой СМП (4), поступления в клинику, стационар, госпиталь, сосудистый центр (5) для квалифицированного лечения. Из-за позднего обращения и затрудненного уличного движения задерживается начало терапии, определяя разные временные интервалы (от проявления симптомов поражения до начала терапии) для выбора тактики лечения (рис. 3) [15]. При этом тромболитическую терапию можно

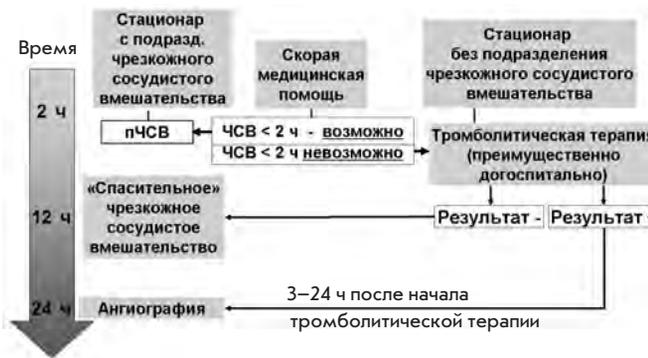


Рис. 4. Реперфузионная стратегия при доставке пациента с острым инфарктом миокарда с подъемом ST-сегмента на ЭКГ в зависимости от времени, прошедшего с начала развития симптомов поражения.

осуществлять еще на догоспитальном этапе бригадой СМП [13], а в перспективе – и дома, даже посредством самопомощи. Однако, несмотря на медленное решение организационных проблем и современные финансово-медицинские реалии России, тромболитическая и ангиопластика представляются не взаимоисключающими, а взаимодополняющими способами (рис. 4) [16]. Такой подход определяется наличием и близостью к пациенту клиник, оснащенных средствами сосудистой ангиопластики и стентирования, действиями бригад СМП, своевременным проведением тромболитической терапии (особенно при отсутствии возможности чрескожного коронарного вмешательства). В ряде случаев (рис. 4) используется комбинация тромболитической терапии и ангиопластики. При современном уровне российского здравоохранения последний подход выглядит вполне перспективным. В целом, проблемы просвещения пациентов, совершенствования организации кардиологической помощи («пять дверей») и ее средств (разработка новых стентов и тромболитиков) остаются актуальными. Однако разнообразие приемов реперфузионной терапии и ее высокая стоимость снизили инвестиционную привлекательность этой области, что подтверждается результатами современных биомедицинских исследований тромболитических производных.

СОВРЕМЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТРОМБОЛИТИКОВ НАПРАВЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

Широкое (еще 15–20 лет назад) изучение новых тромболитиков [5, 9] к настоящему времени существенно сузилось. Не развивается конструирование биоконъюгатов направленного действия на основе векторной (определяющей распознавание и связывание с мишенью) и лекарственной (обеспечивающей терапев-

тический эффект) частей, связанных с биodeградируемой матрицей носителя (рис. 5). Не используются антитела (или их фрагменты) против фибрина; фибриноген (как вектор и носитель) или его компоненты; комплементарное комбинированное воздействие на тромб сочетания разных форм t-PA и u-PA. В качестве детерминант тромботического поражения стали применять маркеры повреждения эндотелиальной поверхности сосудов [4]. Конечно, они должны иметь низкое содержание в крови и на других типах клеток, доступных кровотоку; экспрессироваться на эндотелии с плотностью, достаточной для связывания, необходимого для достижения терапевтических целей и не вызывающего вредных побочных эффектов. Так, для применения при легочной эмболии получили биоконъюгат урокиназы с моноклональными антителами (RE8F5) против поверхностного мембранного белка эндотелия капилляров легких, связанных с помощью 4-сукцинимидилоксикарбонил- α -метил- α -(2-пиридилдитио)-толуола (SMPT) с сохранением 85% начальной урокиназной активности [17]. На модели легочной эмболии такой конъюгат в 12–16 раз усиливал тромболитическое действие урокиназы и ретавазой без системной активации плазминогена и истощения уровня фибриногена. При этом ковалентное связывание компонентов конъюгата при помощи дисульфидной связи (при ее достаточно поверхностном расположении) оставляет сомнения в стабильности конъюгата и устойчивой перспективе его практической разработки. Весьма интересным оказался подход к профилактике цереброваскулярных тромбозов [18]. Ассоциация биотинилированного t-PA с биотинилированными эритроцитами через стрептавидин приводила к быстрой и продолжительной реперфузии у мышей с церебральным тромбозом, в отличие от действия самого t-PA, введенного даже в десятикратно больших дозах [19]. Полученный аддукт обладал увеличенным временем полужизни в кровотоке, способностью лизировать свежие тромбы (но не старые гемостатические пробки), слабее отвечал на действие ингибитора активатора плазминогена первого типа [20]. Эритроциты показали себя как эффективные носители t-PA для тромбопрофилактики, но необходимо было их модифицировать *ex vivo* для связывания с t-PA перед введением в организм. Избежать такой сложной модификации можно, в частности, при помощи антител к мембранным белкам эритроцитов. Так, гликофорин А обильно представлен на поверхности эритроцитов. Использование одноцепочечного антитела (scFv) против гликофорина А в составе рекомбинантной белковой формы с низкомолекулярной одноцепочечной урокиназой, селективно активируемой тромбином (scu-PA-T) [21], или с мутиним t-PA (крингл-домен 2 и протеазный



Рис. 5. Схематическое представление модели биоконъюгата для направленного транспорта лекарств в организме. С биodeградируемой матрицей полимерного носителя ковалентно связаны векторная и лекарственная части биоконъюгата.

домен) [22] обеспечивает их связывание с эритроцитами (40–95%) и значительно увеличивает время циркуляции в кровотоке (через 48 ч в нем остается ~35% от введенной дозы). По результатам этих работ профилактическую доставку разных форм активаторов плазминогена к эритроцитам можно рассматривать как новый подход к предупреждению тромбозов в клинических условиях, когда риск окклюзии сосудов высок.

Получен рекомбинантный одноцепочечный урокиназный активатор плазминогена низкой молекулярной массы (lmw-scuc-PA), слитый с одноцепочечным переменным фрагментом антител (scFv) к молекуле тромбоцитарно-эндотелиальной адгезии (PESAM-1) [23]. На примере этого слитого белка было показано, что молекулы клеточной адгезии, расположенные на эндотелии, могут служить мишенями для доставки лекарственных средств. Рекомбинантная форма пролекарства lmw-scuc-PA-scFv специфически связывалась с клетками, экспрессирующими PESAM-1 [23] и после расщепления плазмином (по центрам тромбообразования) связи Lys158–Ile159 в урокиназном фрагменте (lmw-scuc-PA) превращалась в фибринолитически активную форму lmw-tcu-PA. После внутривенного введения полученный препарат накапливался в легких мышей дикого типа (но не мышей с нокаутом PESAM-1), эффективнее, чем lmw-scuc-PA, лизировал легочные эмболы, быстро выводился из кровотока. Это указывает на перспективность использования слитых белков на основе молекул клеточной адгезии и проактиваторов плазминогена для тромбопрофилактики [4, 23].

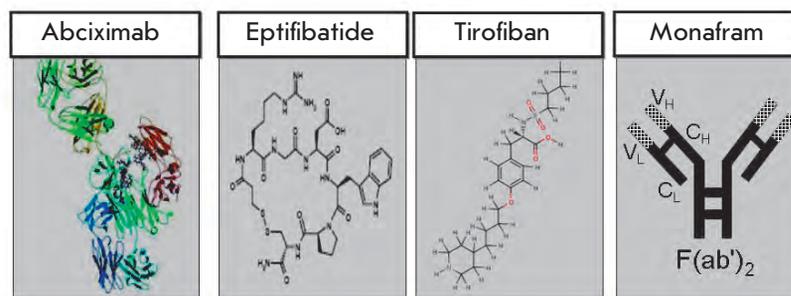


Рис. 6. Представление вида и основных свойств блокаторов рецепторов гликопротеина IIb/IIIa.

	Абсиксимаб (РеоПро) Eli Lilly	Эптифибатид (интегрилин) Cor Therapeutics Shering Plough	Тирофибан (агростат) Merck	Монафрам (руциромаб) РКНПК МЗ РФ
Тип	Антитело	Пептид	Не пептид	Антитело
Молекулярная масса, Да	~50 000	~800	~500	~100 000
Связывание с тромбоцитами	ч	с	с	ч
$t_{1/2}$ в плазме	мин	2.5 ч	3 ч	< 3 ч
Длительность восст. функ. тромбоцитов на 50%	12 ч	2–4 ч	~4 ч	> 24 ч
Связь с другими интегриними	$\alpha 5\beta 3$ Mac-1	–	–	–

Последовательным изучением биоконъюгатов, обладающих направленным фибринолитическим действием, занимается группа В.Р. Музыкантова [4, 19–23] из Филадельфии (США). Другие научные коллективы либо сменили направления исследований, либо их данные эпизодичны [17, 18]. Открытыми остаются вопросы иммуногенности рекомбинантных форм, их применимость при острых поражениях, развитие побочных реакций. Появление в арсенале врача тенектеплазы (метализе) и ретеплазы (ретаваза) оставляет надежду на успешность проводимых разработок.

КЛИНИЧЕСКАЯ ПРАКТИКА НАЦЕЛЕННЫХ АНТИТРОМБОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Стабилизации эффектов реперфузионной терапии служат весьма разнообразные антитромботические средства. Они включают стандартное антитромбинное воздействие (гепарин, гепарин низкой молекулярной массы (эноксипарин)), прямые ингибиторы тромбина (бивалирудин, дабигатран), ингибиторы фактора Ха – прямые (апиксабан, ривароксабан, отамиксабан) и непрямые (фондапаринукс) [24], ингибиторы активируемого протеазами рецептора 1 (PAR-1), блокаторы продукции тромбоксана A_2 , ТХА₂ (ацетилсалициловая кислота и др.), антагонисты рецептора P2Y₁₂ (клопидогрель, прасугрель, тикагрелор, кангрелор и др.) [25]. С позиций концепции

направленного транспорта лекарств (в отношении белковых производных) актуальным является применение антагонистов гликопротеина IIb/IIIa [26] для ингибирования агрегации тромбоцитов при ангиопластике у больных с острым коронарным синдромом [27]. Клинически доступные препараты представлены на рис. 6. Следует заметить, что тирофибан и эптифибатид, продвигающиеся к утверждению на фармацевтическом рынке, заметно дешевле абсиксимаба и монафрама (в России непатентованное название – руциромаб). Пептидомиметик тирофибан представляет собой низкомолекулярное соединение непептидной природы, а эптифибатид – небольшой пептид. Абсиксимаб же состоит из Fab-фрагмента рекомбинантного химерного антитела из переменных участков мышинового моноклонального антитела 7E3 против гликопротеина IIb/IIIa и константных участков иммуноглобулина G человека, а монафрам – это F(ab')₂-фрагмент моноклональных антител против гликопротеина IIb/IIIa. Конкуренция за расширенное использование названных препаратов в клинической практике продолжается в настоящее время. Следует заметить, что «антительная» природа абсиксимаба и монафрама обеспечивает их эффективное распознавание гликопротеинами IIb/IIIa и связывание с тромбоцитами, что ингибирует их агрегацию.

Среди эффективных антитромботических препаратов интерес для клинической практики,

как и в случае активаторов плазминогена третьего поколения, представляют не полноразмерные белковые молекулы, а их фрагменты [28]. По ряду фармакологических свойств соединения с молекулярной массой менее 400 Да оказываются более предпочтительными, чем их более крупные («тучные») виды. Более того, стремясь повысить эффективность производного и специфичность его взаимодействия с клеточными рецепторами или легкость прохождения через мембрану, обычно увеличивают липофильность изучаемого соединения. Однако из-за этого снижается растворимость соединения, оно становится метаболически стабильным, резко проявляются его серьезные побочные эффекты и сильно повышается токсичность (как следует из результатов сравнения токсичности соединений, исследованных в 1991 и 2000 гг.). По этой причине прекращается изучение множества потенциальных лекарств [28].

Традиционно в структуре белка выделяют четыре уровня организации – первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуру. Однако существуют и другие градации [29], согласно которым в молекуле белка можно выделить первичную (последовательность аминокислот), вторичную (альфа-спираль, бета-структура и др.), сверхвторичную (ансамбли взаимодействующих между собой вторичных структур, например, суперспирализация альфа-спиралей – скручивание двух альфа-спиралей вокруг друг друга) структуры, структурные домены (определяемые, в частности, по анализу карт электронной плотности и соответствующие глобуле диаметром 2,5 нм, отвечающей принципу простоты сворачивания белковой цепи), а также глобулярные белки, агрегаты. В настоящее время приоритет в области разработки кардиологических биофармацевтиков отдается белковым доменам и их разным сочетаниям, что, конечно же, не отменяет необходимости досконального исследования их иммуногенности и токсичности.

РАЗРАБОТКА ПРОИЗВОДНЫХ ДЛЯ СМЕЖНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ

Другие подходы, направленные на закрепление и усиление эффектов реперфузионной терапии, в большей степени связаны не с клиническими, а с исследовательскими работами. С целью блокирования и уменьшения вредных последствий окислительного стресса, когда избыточно образующиеся активные формы кислорода неселективно поражают молекулы, ткани и органы, разрабатываются антиоксиданты, обладающие тропностью к очагу поражения [30]. Это – формирующаяся область антиоксидантной терапии, поскольку окислительный стресс сопровождается развитием сердечно-сосудистых нарушений. Имеется множество антиоксидантов (например, ви-

таминной или фенольной природы), обладающих разным клиническим эффектом. Вместе с тем высокой эффективностью и специфичностью антиоксидантного действия отличаются оксидоредуктазы. К ферментам, обладающим антиоксидантной активностью, относятся имеющиеся в организме человека супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), глутатионпероксидаза. СОД представлена тремя изоформами: цитозольной Cu,Zn-СОД (СОД-1), митохондриальной Mn-СОД (СОД-2) и внеклеточной СОД (СОД-3, ВК-СОД).

ВНЕКЛЕТОЧНАЯ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА

Повышенное содержание одного из видов активных форм кислорода – супероксидного радикала (O_2^-) – отмечалось в артериях крыс со спонтанной гипертензией. Перенос гена ВК-СОД таким крысам улучшал функцию их эндотелия и снижал артериальное давление [31]. Предполагается, что взаимодействие O_2^- с NO первоначально происходит во внеклеточном пространстве [32]. Среди всех антиоксидантных ферментов только ВК-СОД локализуется на сосудистой люминальной поверхности, где она взаимодействует с гепарансульфатпротеогликаном своим гепарансвязывающим доменом [30, 32]. Вероятно, ВК-СОД может располагаться по всей глубине сосудистой стенки, в том числе между эндотелием и сосудистой мышцей [33]. Введение гепарина (в концентрациях, применяемых в терапии) приводит к высвобождению ВК-СОД, связанной с эндотелиальными и другими клетками, в кровотока [32, 34]. Антиоксидантное действие ВК-СОД проявляется, главным образом, на сосудистой стенке, а не в объеме кровотока [30, 32]. Обнаружено, что заболевания коронарных сосудов человека связаны со сниженным уровнем высвобождаемой гепарином ВК-СОД [35, 36]. Отмечалась положительная корреляция между уровнем высвобождаемой гепарином ВК-СОД и содержанием холестерина липопротеидов высокой плотности и возрастом [36]. Протективный эффект ВК-СОД связывают с защитой сосудистого дилататора NO, который диффундирует от эндотелия к гуанилатциклазе гладкомышечных клеток [30, 32, 37], что подтверждается данными, полученными на модели объем-зависимой (высокообъемной) гипертензии у мышей (1-почка-1-зажим) [38]. При этом у мышей дикого типа и с нокаутом гена ВК-СОД наблюдается ухудшение зависимой от эндотелия дилатации, повышение артериального давления и сосудистый окислительный стресс. Рекомбинантная ВК-СОД снижала артериальное давление и улучшала биодоступность NO в аорте мышей дикого типа и у мышей с нокаутом ВК-СОД, но не снижала артериальное давление у мышей с нокаутом эндотелиальной NO-синтазы и у мышей дикого типа,

получавших ингибитор NO-синтазы. Эти результаты наглядно показали, что направленные сосудистые эффекты рекомбинантной ВК-СОД опосредуются NO [38] и указывают, наряду с другими данными [39–41], на важную роль этого биокатализатора при гипертонии. Помимо атеросклероза [30, 32] и гипертонии окислительный стресс и ферментные антиоксиданты играют важную роль в развитии сахарного диабета и сердечной недостаточности [32]. Широкое протективное действие ферментных антиоксидантов подчеркивает актуальность их использования для разработки новых средств смежной терапии.

МОДИФИКАЦИЯ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

Низкая аффинность СОД-1 к мембранам клеток, где образуются активные формы кислорода, ее невысокая стабильность в плазме крови и небольшой срок пребывания в кровотоке указывали на необходимость получения лецитинизированной СОД, в которой четыре молекулы фосфатидилхолина были ковалентно присоединены к димерному ферменту [42]. Благодаря модификации лецитином такая СОД обладала повышенной тропностью к клеточной мембране, она ослабляла поражение мышцей с язвенным колитом уже после ежедневного внутривенного введения в течение 7 дней, тогда как для достижения такого же эффекта нативный фермент нужно было вводить в 30 раз больших дозах [42]. Существенно лучший эффект применения лецитинизированной СОД наблюдали и при индуцированном блеомицином фиброзе легких у мышцей [43]. Подобное нацеливание белковых агентов на очаг поражения в результате их модификации в заметной мере определяется размером полученных конъюгатов [44]. Так, оптимальной тропностью к легочному эндотелию (определяемой эффективностью и специфичностью нацеливания) обладали конъюгаты СОД с антителами против PЕСАМ-1 размером 300 нм. Предполагается, что подобная доставка конъюгата СОД с моноклональными антителами против PЕСАМ-1 в эндосомы эндотелия может иметь выраженный противовоспалительный эффект [45].

СОПРЯЖЕНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗНОЙ И КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

В ходе изучения возможности защиты от оксидантов при помощи супероксиддисмутаз [32, 34, 46, 47] не могли не обнаружить инактивации эндогенного фермента пероксидом водорода [38]. Применение *in vivo* КАТ (внутривенная болюсная инъекция производного каталаза-полиэтиленгликоль в течение 3 дней) снижало артериальное давление у мышцей дикого типа со спонтанной гипертонией (но не с нокаутом ВК-СОД) и улучшало *ex vivo* функцию эндотелия аорты. Эти данные ясно указывали на центральную

роль пероксида водорода в инактивации эндогенной ВК-СОД [38, 48]. На культурах клеток показана польза снижения уровня пероксида водорода в условиях окислительного стресса. Сверхэкспрессия КАТ защищала эндотелий аорты человека от апоптоза, вызванного окисленными формами липопротеидов низкой плотности (окЛПНП) [49]. Такие данные указывали на целесообразность одновременного присутствия активности СОД и КАТ для защиты от сосудистого окислительного стресса. С этой целью применяли различные формы этих ферментов (как в виде смеси, так и в виде конъюгатов друг с другом).

КОМБИНИРОВАНИЕ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ С КАТАЛАЗОЙ

Результаты сочетанного применения нативных форм СОД и КАТ оказались весьма противоречивыми [30, 46]. Для проявления лечебного эффекта необходимо одновременное функционирование СОД и КАТ в очаге развития поражения [50]. Обеспечить это удалось при помощи биферментного конъюгата, в котором СОД-1 ковалентно присоединили к КАТ через хондроитинсульфат (ХС) – гликозаминогликан сосудистой стенки, и получили аддукт СОД-ХС-КАТ [46]. Такое конъюгирование изменяло свойства СОД-1, превращая ее в более близкую к гликопротеину СОД-3-форму [30, 51, 52]. В полученном СОД-ХС-КАТ-конъюгате СОД и КАТ катализируют две последовательные реакции, в которых продукт СОД – пероксид водорода – служит субстратом для катализируемой

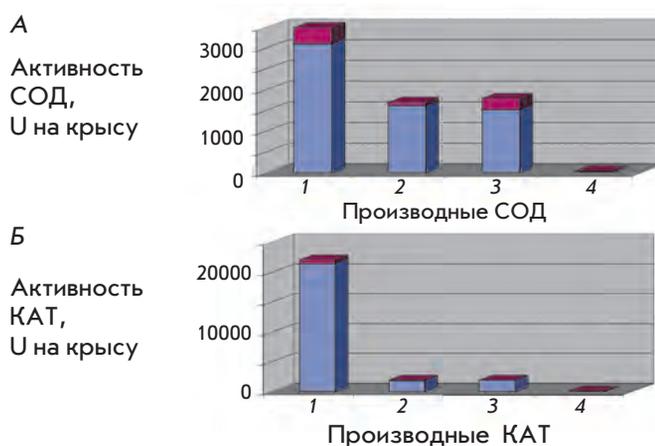
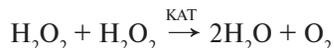
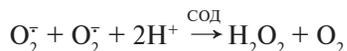


Рис. 7. Сравнение интервалов оптимальных доз анти-тромботического действия производных супероксиддисмутазы (А) и каталазы (Б) (СОД и КАТ соответственно). 1 – Нативный фермент; 2 – ковалентный конъюгат фермента с хондроитинсульфатом (ХС); 3 – смесь производных СОД-ХС и КАТ-ХС; 4 – биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ.

КАТ реакции и превращается в безопасные воду и молекулярный кислород (схема реакций приведена ниже):



На модели артериального тромбоза у крыс, вызванного обработкой сосуда насыщенным раствором хлористого железа, биферментный конъюгат СОД-ХС-КАТ проявлял антитромботический эффект в дозах, на два порядка меньших, чем нативные СОД и КАТ, и на порядок меньших, чем модифицированные хондроитинсульфатом СОД и КАТ или их смесь (рис. 7) [50]. Сшивка белков ХС призвана направлять биферментный конъюгат к зонам сосудистого поражения. Известно, что в участках атеросклеротического поражения сосудов повышено содержание ХС [30]. Раннее утолщение интимы сосудистой стенки при атерогенезе также связано с накоплением ХС [53]. У атеросклеротических новозеландских белых кроликов после установки стентов наблюдалось экспонирование хондроитинсульфатпротеогликана в подвергнутом

хирургическому вмешательству субэндотелиальном слое артерии [54]. Представленные данные подчеркивают возможность и действенность использования компонентов гликокаликса сосудистых клеток для направленной доставки лекарств [53, 55].

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ КОНДИЦИОНИРОВАНИЕ МИОКАРДА

Эффективность лекарственной коррекции нарушений сердечно-сосудистого метаболизма связана и с другим подходом, который опирается на формирование мишени для фармакологического взаимодействия. В результате применения чередующихся кратковременных эпизодов ишемии/реперфузии до или после периода тяжелой, сравнительно длительной ишемии, последствия ишемии оказываются существенно легче, чем в отсутствие этой процедуры (рис. 8). Если после механического воздействия на миокард (в форме его пре- и посткондиционирования) определить метаболические цели, пригодные для успешной лекарственной коррекции, то можно применять приемы фармакологического пре- и посткондиционирования миокарда (рис. 9) [56]. Таким образом, для эффективного взаимодействия с терапевтическим агентом необходимо установить и подготовить чувствительную к нему мишень сердечно-сосудистого поражения.

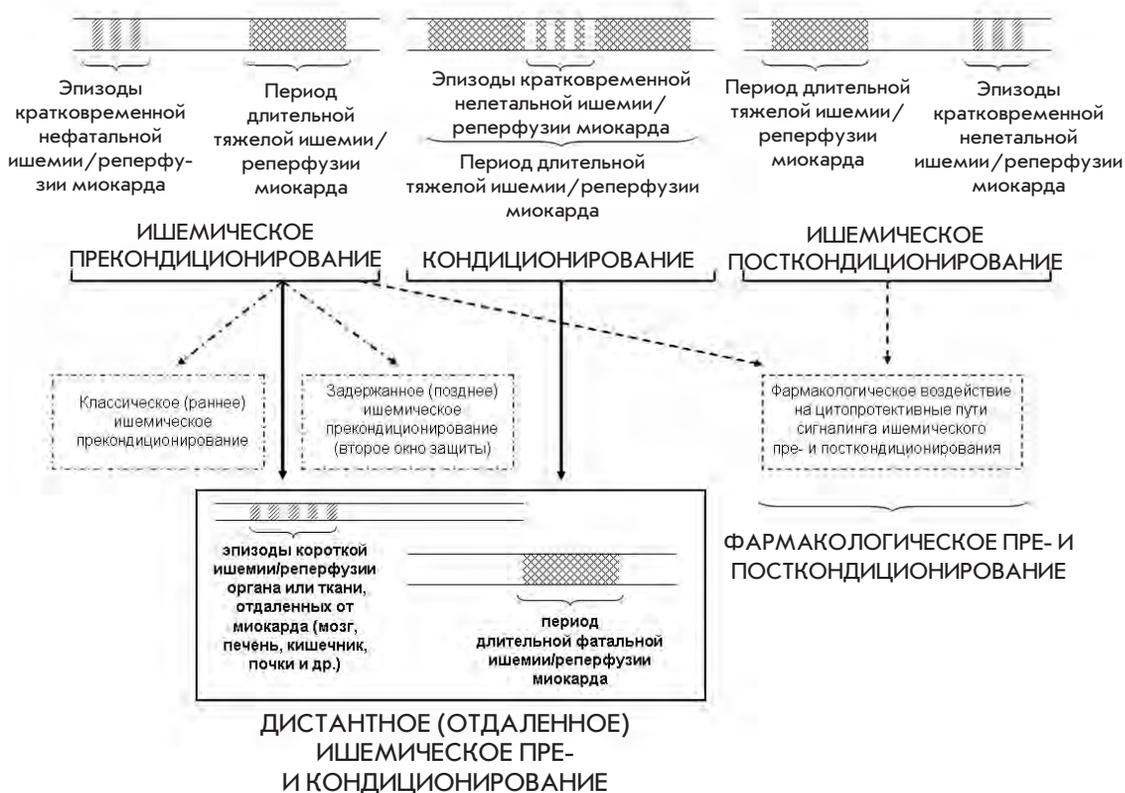


Рис. 8. Схема путей развития и взаимодействия ишемического пре- и посткондиционирования миокарда и его фармакологического кондиционирования.



Рис. 9. Схема развития исследований пре- и посткондиционирования миокарда и их связь с прогрессом в области биохимии и клеточной биологии, обобщаемых на новом уровне широким проведением генотипирования пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить снижение интереса к исследованиям, выполняемым в рамках концепции направленного транспорта лекарств и связанным с разработкой биоконъюгатов для кардиологии. Клинического использования достигли такие «сокращенные» формы белков, как тенектеплаза, ретеплаза, абсиксимаб, монафрама. Очевидной становится необходимость изменения векторной части биоконъюгатов, когда все чаще используются не антитела к компонентам тромба, а к маркерам развивающегося поражения (молекулы клеточной адгезии, компоненты гликокаликса и др.). Выявлена важность для эффективного и специфичного нацеливания лекарств таких параметров, как размер биоконъюгата, плотность локального накопления мишеней-маркеров в развивающемся очаге поражения, применение комбинированного воздействия катализаторов сопряженных ферментативных реакций. Значимость концепции направленного транспорта лекарств, определяющая раньше стратегию конструирования биоконъюгатов, снижается. Все большее значение приобретают модификации разрабатываемых производных, придающие им дополнительные полезные свойства (более низкую эффективную дозу, простоту применения, пролонгированность действия) при заметной величине их терапевтического эффек-

та и безопасности применения. Появляются также новые подходы к кондиционированию миокарда, что способствует точному определению и формированию значимых мишеней для сердечно-сосудистой терапии. Это обещает модернизацию концепции направленного транспорта лекарств при разработке кардиологических биофармацевтиков и позволит перейти к созданию препаратов направленного действия следующего поколения. ●

Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в отборе и составлении материала, его обсуждении и представлении профессорам Кардиологического центра (ФГБУ РКНПК Минздравсоцразвития РФ) Е.П. Панченко и И.И. Староверову.

Глубоко признателен автор академику Е.И. Чазову и чл.-корр. РАН В.Н. Смирнову за внимание и поддержку исследовательско-аналитических усилий его лаборатории. Настоящая работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 12-08-00010 и 12-04-00015), а также Министерства здравоохранения и социального развития России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erlich P. *Physiology or medicine 1901–1921*. Amsterdam: Elsevier Publishing Co., 1967. P. 304–320.
2. Чазов Е.И., Смирнов В.Н., Торчилин В.П. // Журн. ВХО им. Д.И. Менделеева. 1987. Т. XXXII. № 5. С. 485–487.
3. Максименко А.В. // Журн. ВХО им. Д.И. Менделеева. 1987. Т. XXXII, № 5. С. 541–547.
4. Ding B.-S., Dziubla T., Shuvaev V.V., Muro S., Muzykantov V.R. // *Mol. Interv.* 2006. V. 6. № 2. P. 98–112.
5. Максименко А.В. // *Молекуляр. биология*. 1995. Т. 29. № 1. С. 38–60.
6. Boytsov S., van de Werf F. // *Am. Heart J.* 2011. V. 161. № 3. P. 427–430.
7. Hamm C.W., Bertrand M., Braunwald E. // *Lancet*. 2001. V. 358. № 9292. P. 1533–1538.
8. Davies M.J. // *Heart*. 2000. V. 83. № 3. P. 361–366.
9. Максименко А.В. // *Биоорган. химия*. 1999. Т. 25. № 8. С. 563–571.
10. Bode C., Smalling R.W., Berg G., Burnett C., Lorch G., Kalbfleisch J.M., Chernoff R., Christie L.G., Feldman R.L., Seals A.A., et al. // *Circulation*. 1996. V. 94. № 5. P. 891–898.
11. Cannon C.P., McCabe C.H.G., Gibson C.M., Ghali M., Sequeira R.F., McKendall G.R., Breed J., Modi N.B., Fox N.L., Tracy R.P., et al. // *Circulation*. 1997. V. 95. № 2. P. 351–356.
12. Явелов И.С. // *Кардиология*. 2007. Т. 47. № 1. С. 37–46.
13. Катаев Ю.В., Тиунов В.К., Гужва А.Н., Козиолова Н.А., Смышляева М.М. // *Болезни сердца и сосудов*. 2011. Т. 6. № 1. С. 14–16.
14. Braunwald E. // *New Engl. J. Med.* 1997. V. 337. № 19. P. 1360–1369.
15. Huber K., De Caterina R., Kristensen S.D., Verheugt F.W.A., Montalescot G., Badimon Maestro L., van de Werf F. // *Eur. Heart J.* 2005. V. 26. № 19. P. 2063–2074.
16. van de Werf F., Bax J., Betriu A., Blomstrom-Lundqvist C., Crea F., Falk V., Filippatos G., Fox K., Huber K., Kastrati A., et al. // *Eur. Heart J.* 2008. V. 29. № 23. P. 2090–2945.
17. Ding B.-S., Zhou Y.-J., Chen X.-Y., Zhang J., Zhang P.-X., Sun Z.-Y., Tan X.-Y., Liu J.-N. // *Circulation*. 2003. V. 108. P. 2892–2898.
18. Schneider D.J., Sobel B.E. // *Circulation*. 2008. V. 118. P. 1408–1409.
19. Danielyan K., Ganguly K., Ding B.-S., Atochin D., Zaitsev S., Murciano J.-C., Huang P.L., Kasper S.E., Cines D.B., Muzykantov V.R. // *Circulation*. 2008. V. 118. P. 1442–1449.
20. Ganguly K., Murciano J.-C., Westrick R., Leferovich J., Cines D.B., Muzykantov V.R. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007. V. 321. № 1. P. 158–164.
21. Zaitsev S., Spitzer D., Murciano J.-C., Ding B.-S., Tliba S., Kowalska M.A., Marcos-Contreras O.A., Kuo A., Stepanova V., Atkinson J.P., et al. // *Blood*. 2010. V. 115. № 25. P. 5241–5248.
22. Zaitsev S., Spitzer D., Murciano J.-C., Ding B.-S., Tliba S., Kowalska M.A., Beleir K., Kuo A., Stepanova V., Atkinson J.P., et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010. V. 332. № 3. P. 1022–1031.
23. Ding B.-S., Gottstein C., Grunow A., Kuo A., Ganguly K., Akbelda S.M., Cines D.B., Muzykantov V.R. // *Blood*. 2005. V. 106. № 13. P. 4191–4198.
24. Hochtl T., Farhan S., Wojta J., Huber K. // *Heart*. 2011. V. 97. P. 244–252.
25. Becker R.C., Gurbel P.A. // *Thromb. Haemost.* 2010. V. 103. P. 535–544.
26. Панченко Е.П. // *Тер. архив*. 1997. Т. 69. № 9. С. 66–71.
27. Певзнер Д.В., Староверов И.И., Самко А.Н., Фролова А.Н., Мазуров А.В., Руда М.Я. // *Кардиология*. 2010. Т. 50. № 6. С. 22–26.
28. Hann M.M. // *Med. Chem. Commun.* 2011. V. 2. P. 349–355.
29. Shulz G.E., Schirmer R.H. *Principles of protein structure*. New York–Heidelberg–Berlin: Springer Verlag, 1979.
30. Максименко А.В. // *Хим.-фарм. журн.* 2007. Т. 41. № 5. С. 3–12.
31. Chu Y., Iida S., Lund D.D., Weiss R.M., DiBona G.F., Watanabe Y., Faraci F.M., Heistad D.D. // *Circ. Res.* 2003. V. 92. P. 461–468.
32. Heistad D.D. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2006. V. 26. P. 689–695.
33. Onry T.D., Day B.J., Crapo J.D. // *Lab. Invest.* 1996. V. 75. P. 617–636.
34. Fukai T., Folz R.Z., Landmesser U., Harrison D.G. // *Cardiovasc. Res.* 2002. V. 55. P. 239–249.
35. Landmesser U., Merten R., Spiekermann S., Büttner K., Drexler H., Hornig B. // *Circulation*. 2000. V. 101. P. 2264–2270.
36. Tasaki H., Yamashita K., Tsutsui M., Kamezaki F., Kubara T., Tanaka S., Sasaguri Y., Adachi T., Nakashima Y. // *Atherosclerosis*. 2006. V. 187. P. 131–138.
37. Wolin M.S. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000. V. 20. P. 1430–1442.
38. Jung O., Marklund S.L., Xia N., Busse R., Brandes R.P. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. V. 27. P. 470–477.
39. Gongora M.C., Qin Z., Lande K., Kim H.W., McCann L., Folz J.R., Dikalov S., Fukai T., Harrison D.G. // *Hypertension*. 2006. V. 48. P. 473–481.
40. Jung O., Marklund S.L., Geiger H., Pedrazzini T., Busse R., Brandes R.P. // *Circ. Res.* 2003. V. 93. P. 622–629.
41. Welch W.J., Chabrashvili T., Solis G., Chen Y., Gill P.S., Aslam S., Wang X., Ji H., Sandberg K., Jose P., Wilcox C.S. // *Hypertension*. 2006. V. 48. P. 934–941.
42. Ishichara T., Tanaka K., Tasaka Y., Namba T., Suzuki J., Okamoto S., Hibi T., Takanaga M., Igarashi R., Sato K., et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009. V. 328. № 1. P. 152–164.
43. Tanaka K.I., Ishichara T., Azuma A., Kudoh S., Ebina M., Nukiwa T., Sugiyama Y., Tasaka Y., Namba T., Ishichara T., et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010. V. 298. № 3. P. L348–L360.
44. Shuvaev V.V., Tliba S., Pick J., Arguiri E., Christofidou-Solomidou M., Albelda S.M., Muzykantov V.R. // *J. Control. Rel.* 2011. V. 149. № 3. P. 236–241.
45. Shuvaev V.V., Han J., Yu K.J., Huang S., Hawkins B.J., Madesh M., Nakada M., Muzykantov V.R. // *FASEB J.* 2011. V. 25. P. 348–357.
46. Maksimenko A.V. // *Curr. Pharm. Design*. 2005. V. 11. P. 2007–2016.
47. Carlsson L.M., Marklund S.L., Edlund T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. P. 5219–5222.
48. Fukai T. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007. V. 27. P. 442–444.
49. Lin S.J., Shyne S.K., Liu P.L., Chen Y.H., Ku H.H., Chen J.W., Tam K.B., Chen Y.L. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004. V. 36. P. 129–139.
50. Maksimenko A.V., Golubykh V.L., Tischenko E.G. // *J. Pharmacol. Pharmacol.* 2004. V. 56. P. 1463–1468.
51. Marklund S.L. // *J. Clin. Invest.* 1984. V. 74. P. 1398–1403.
52. Stralin P., Karlsson K., Johansson B.O., Marklund S.L. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995. V. 15. P. 2032–2036.
53. Максименко А.В. // *Хим.-фарм. журн.* 2008. Т. 42. № 10. С. 3–13.
54. Joner M., Morimoto K., Kasukawa H., Steigerwald K., Merl S., Nakazawa G., John M.C., Finn A.V., Acampado E., Kolodgie F.D., et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. P. 1960–1966.
55. Sarembock I.J. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. P. 1879–1881.
56. Лупанов В.П., Максименко А.В. // *Кардиоваск. терапия и профилактика*. 2011. Т. 10. № 1. С. 96–103.